

# El fenómeno de quelación en la bioquímica de los oligoelementos

Por A. SANTOS RUIZ

Discurso de apertura de curso de la Real Academia de Farmacia de Madrid Año académico 1958-1959

EXCELENTÍSIMO SEÑOR;

SEÑORES ACADÉMICOS;

SEÑORAS Y SEÑORES:

Hablar es muy difícil y callarse se considera en la espiritualidad como la ciencia de las ciencias. No obstante, las razones protocolarias de inauguración de un nuevo curso académico de la Real Academia de Farmacia me obligan, y ello es para mí un grato deber, a dirigiros la palabra desde esta ilustre tribuna.

Sabidamente ya advierte la Escritura que “la muerte y la vida están en poder de la lengua”, y es mi ferviente deseo que este discurso, aunque no sea *vital* tenga vida. He escogido como tema uno candente y muy en relación con mis aficiones y estudios; como sabéis, me voy a referir al fenómeno de quelación en la bioquímica de los oligoelementos.

Los oligoelementos son esencialmente agentes catalíticos y su actuación en los procesos biológicos presenta una gran variedad de posibilidades. Buena muestra de éstas son los efectos oligodinámicos de algunos metales, los frecuentes fenómenos de oligosinergia -que pueden ser de carácter más o menos específico-, así como la actuación en catálisis de tipo negativo o inhibitorio y, sobre todo, la complejidad de sus relaciones con las vitaminas, hormonas y enzimas.

La expresión oligoelementos biocatalizadores sería la más correcta y completa para designar, en español al menos, a los elementos químicos que se hallan en los organismos vegetales y animales en muy pequeñas cantidades y que desempeñan funciones biológicas de tipo catalítico con arreglo a las modalidades señaladas por distintos autores. No obstante, puesto que el uso que se ha hecho del vocablo oligoelemento hace ya presuponer en éste un significado de carácter biocatalítico, afirma DEAN que en el lenguaje ordinario bastará utilizar, simplemente, la palabra oligoelemento, sin necesidad de adjetivaciones.

El problema de los oligoelementos en su relación con la vida, intuido y demostrado por RAULIN en el *Aspergillus niger* y perfeccionado en nuestros tiempos por BERTRAND, ha estimulado ulteriormente a una pleyade de investigadores. Desde hace ya unos quince años nosotros, con DEAN GUEL BENZU, LÓPEZ AZCON A, SAN PEDRO PIÑEIRO y FERNANDEZ SÁNCHEZ, principalmente, venimos trabajando en temas relacionados con estos elementos químicos. Basta ahora nuestros experimentos realizados en la extinguida Sección de Bioquímica del Instituto Cajal y en el hoy Departamento de Bioquímica del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica y en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de Madrid- se han dirigido preferentemente a lograr una idea general acerca del contenido y distribución de dichos oligoelementos en los materiales analizados.

Nuestros conocimientos sobre la importancia de los elementos químicos que se presentan en pequeñísimas cantidades en el organismo humano tienen muchas lagunas y por ello pueden hacerse múltiples conjeturas. Así admitimos que el agua de mar es superior a la sal común a causa de los oligoelementos contenidos en ella; que los jugos de frutas y el pan integral poseen también elementos químicos esenciales que impiden ciertas carencias, y que las pastas de dientes, con adición de algunos de estos microcomponentes, deben ser especialmente buenas. En realidad, son convenios no siempre identificables con el conocimiento científico y hay que evitar, por tanto, la especulación. Estamos de acuerdo con GLATZEL en que si no se sabe delimitar, entre ciencia y juicios personales subjetivos, cabe una completa confusión.

En consecuencia, debemos referirnos exclusivamente a aquello que pueda probarse de las acciones de los oligoelementos. En este campo existe una investigación sistemática desde hace pocas decenas de años recogidas por ALBAREDA BERRERA, CARDA APARICI, BERG, BERTRAND, DANIEL, DEAN GUEL BENZU, FLASCHENTRAGÈR, GLATZEL, GILBERT, LAMB, LANG, MITCHELL, MÖRNER, WILLIAMS, REITH, SANTOS-RUIZ, SCHARRER, SEEKLES, SCHWARZ, STILES, WALLACE, WILLS, WIRSRSCHAFTER Y TRUFFERT, entre otros.

Los avances en el conocimiento del metabolismo de los oligoelementos luchan con grandes inconvenientes, tales como: la cantidad mínima con que obran, su alto poder de almacenamiento en el organismo y sus lentas transformaciones intraorgánicas.

El conocimiento de la composición aproximada de la célula, tejido y órgano y de algunas fluctuaciones que podamos comprobar experimentalmente puede ser de gran utilidad para el esclarecimiento ulterior de problemas más concretos del metabolismo de los oligoelementos en el ser humano normal y patológico. No olvidemos que indirectamente podemos averiguar si un elemento es necesario para el metabolismo de un ser vivo, al comprobar la constancia de su existencia o su localización persistente en un órgano determinado. Numerosas son las investigaciones analíticas con técnicas físicas y químicas que se han realizado sobre los oligoelementos. Nosotros hemos tenido ocasión de estudiarlos con nuestros colaboradores en asociaciones vegetales, suelos españoles, tejidos de plantas y animales, tejidos humanos y, aisladamente, en algunos otros materiales biológicos. Nuestros resultados han sido motivo de comunicaciones y ponencias en varios congresos internacionales. Sin embargo, era, y es, preciso insistir en el estudio de los elementos catalíticos, especialmente en nuestro país, ya que este trascendental aspecto de las investigaciones bioquímicas comienza a salir ahora de su período embrionario.

El contenido en oligoelementos de los animales y vegetales está sometido a grandes oscilaciones, sujetas, a su vez, en gran parte, a la constitución del suelo, a los abonos y lavado con aguas residuales, a la manera de envasar y conservar los alimentos y a los aditamentos y purificaciones durante el cocinamiento.

En los tejidos participan los oligoelementos en forma activa, como átomos con carga eléctrica, es decir, como aniones y cationes, o en grandes complejos aniónicos o catiónicos, y en forma inactiva como constituyentes de los anaelectrolitos. Su acción no se puede expresar en fórmulas sencillas y se puede afirmar que en las regulaciones enzimáticas específicas es donde está la principal importancia de los

oligoelementos. Se habla mucho hoy día de los llamados microelementos, micronutrientes u oligoelementos nutritivos y, como de otros descubrimientos de la ciencia moderna, hemos aprendido a conceder importancia a algo a lo que antes no se la otorgábamos.

En lo que va de siglo se han reconocido, y aceptado, gran número de elementos químicos como oligoelementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de los animales, microorganismos y plantas superiores. En efecto: de los 102 distintos elementos químicos, naturales y artificiales, que se incluyen en el sistema periódico, hacen falta bastantes para las estructuras y actividades de los seres vivos. La experiencia nos aclara inmediatamente que cualquier elemento encontrado en una proteína será esencial para formas vitales, y así lo comprendemos, sin reservas, para el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. Razonamientos similares nos dicen que el hierro como componente de las hemoglobinas, el magnesio de las clorofilas y el calcio del esqueleto óseo, son tres elementos químicos más, que podemos aceptar como imprescindibles. Otros micronutrientes se reconocen actualmente como necesarios para el desarrollo de los seres superiores, y según el orden en que la evidencia científica hizo que se aceptaran, los mejores conocidos, según STOUT son: manganeso, boro, cinc, cobre, molibdeno y cloro, si bien este último puede considerarse como macrocomponente o elemento plástico..

Se comprende mejor la relación entre oligoelementos y proteidos, considerando que los enzimas los divide VALLEE en dos grupos: metalenzimas y complejos metalenzima. En los metalenzimas aparece un oligoelemento en proporción estequiométrica como componente fijo del proteido y puede aislarse con éste, pero no separarse por diálisis. Si se quita el oligoelemento desaparece la actividad enzimática y queda en pie la inhibición, aunque se añada después el metal correspondiente. En algunos casos el elemento químico está incluido en una estructura porfirínica, como ocurre en las transelectronasas anaerobias y aerobias y en las hidroperoxidases. Los metalproteidos tienen una difusión ubicuitaria en el dominio de las plantas y animales; su presencia en especies muy distantes ratifica su importancia metabólica. Los complejos metalenzima representan un grupo mucho más grande de fermentos en que el metal refuerza su efecto catalítico; pero está muy suelto de la proteína y el elemento químico específico puede eliminarse fácilmente mediante dialización.

Así como los micronutritivos de vegetales presentan en sí un campo de estudio apasionante, también la nutrición con oligoelementos en animales y microorganismos es terreno igualmente fascinante de investigación. Al forzar el aumento de la producción animal se han acentuado las necesidades oligoelementales, y ENSMINGER opina que los científicos necesitan saber más acerca de las relaciones de nutritivos del suelo con la composición química de las plantas y de los animales; examinar sistemáticamente las tierras, las cosechas y los tejidos de los animales; seguir ciertos programas de fertilidad de suelo; analizar más las cenizas en los piensos; revalorizar los elementos químicos y tener más conocimiento de sus necesidades; conocer bien la función de los oligoelementos y sus relaciones entre sí y con otros nutrientes; estudiar mejor las toxicidades y establecer y acoplarse a una ética en la propaganda y venta de mezclas minerales comerciales:

Las interrelaciones entre elementos químicos han tomado mucho auge últimamente y algunas ya se conocen, como las del calcio-fósforo-calciferoles, cobalto-cobalaminas y cobre-molibdeno; otras, como fósforo-nitrógeno y cinc-calcio acaban de salir a la luz. DAVIS ha certificado sobre la imposibilidad de conocer los oligoelementos individualmente sin considerar sus conexiones con otros y con los macroelementos. Ha señalado que, con niveles bajos de ingestión de cobalto, el aumento de molibdeno puede suprimir la síntesis de cobalamina. También se ha preocupado de las relaciones cobre-molibdeno y cobre-azufre. Lo que pareció ser toxicidad de molibdeno para el ganado dio lugar a ensayos que condujeron a admitir que no era posible producir trastornos con este oligoelemento sin una ingestión paralela e inadecuada de proteidos. El azufre y el manganeso parecen también estar conectados con estos efectos nocivos del molibdeno.

El trabajo sobre fluorosis de CRAMPTON ha inducido a la conclusión de que el fluor en tejidos y líquidos corporales tiende a inactivar metales pesados, como el manganeso, que normalmente funcionan como parte de los sistemas enzimáticos.

Estos y otros problemas que plantea la nutrición mineral en general, y la oligoelemental en particular, deben resolverse. El desarrollo de los estudios sobre energía nuclear con los radioisótopos y otras herramientas de la investigación del día abren nuevas rutas a la búsqueda sobre los oligoelementos, que algunos consideraban sin solución hace relativamente pocos años.

FARR ha declarado que hay un campo potencialmente inmenso para la utilización de los isótopos. De los elementos químicos conocidos ahora, unos 700 radioisótopos con vidas medias convenientes u otras características son útiles, por lo menos teóricamente, y más de 650 de éstos se han producido artificialmente. De uso general en el diagnóstico médico o en terapia son los oligoelementos: cobalto-60, oro-198, yodo-131, etcétera. Entre los radioisótopos de oligoelementos, tenemos el manganeso-56, emisor de radiaciones beta y gamma, que tiene una rápida y selectiva movilidad hacia el hígado, y el boro-10 es excelente para la captura de neutrones, que llega a ser 4.000 veces mayor que la de cualquier constituyente corporal, y seguidamente se desintegra en una partícula de litio-7 y otra alfa.

En virtud de su identidad química con los constituyentes corpóreos normales o su estrecha conexión con ellos, el radio-isótopo puede permitir, y permite, la investigación exacta de las reacciones químicas más íntimas en el sistema vivo. Ya conocemos muchas e importantes cosas referentes al metabolismo normal y patológico en animales, plantas y microorganismos, pero el uso más intenso y extenso de los oligoelementos radioactivos llevará indudablemente a mayores progresos.

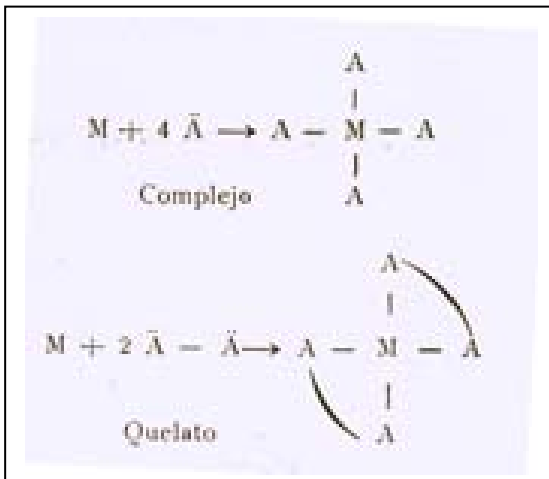
Existe una serie de compuestos químicos, los denominados agentes queladores o quelantes, secuestradores o secuestrantes capaces de fijar o retener, dentro de su molécula, elementos químicos diversos, formando compuestos muy estables denominados quelatos. Los elementos que quedan así incluidos pierden sus propiedades iónicas genuinas. Se puede sospechar la trascendencia de los variados efectos de estos agentes cuando se administran al organismo si tenemos en cuenta su capacidad de captar oligoelementos.

Durante los pasados años se ha llevado a cabo una ardua y extensa labor experimental que relaciona el fenómeno de quelación con la bioquímica oligoelemental de animales, plantas y microorganismos, a la que nos referiremos seguidamente en los diferentes apartados que componen esta disertación.

## EL FENÓMENO DE LA QUELACIÓN

Una gran variedad de moléculas orgánicas son capaces de formar complejos con los metales. Se conocen como compuestos de quelación (del vocablo griego *χηλη* *chele*= garra o pinza), nombre propuesto por MORGAN y DREW. Hasta hace poco se había prestado poca atención a este fenómeno. Los *Biological Abstracts* en sus índices del año 1951 -que se publicaron en 1954- llevan la rúbrica de quelación por primera vez. En 1952 se editó un tratado químico, que hasta hace poco ha sido único, y gran parte de los potentes agentes quelantes en él descritos no han sido estudiados todavía farmacológicamente.

Cuando un ión metálico se combina con un donador de electrones, se dice que la sustancia que se forma es un compuesto complejo o de coordinación. Si la sustancia que se combina con el metal contiene dos o más grupos donadores, de tal manera que forman uno o más anillos, entonces la estructura que resulta es un compuesto quelado o quelato y al donador se le denomina agente quelante. Los enlaces de par de electrones entre el metal y el agente donador que forma el complejo, o el quelato, pueden ser “esencialmente iónicos” o “esencialmente covalentes”, dependiendo de los átomos que intervienen. Ambos casos de formación de complejos y de quelatos se representan esquemáticamente, según MARTELL y CALVIN, de modo siguiente:



en donde M representa un ión metálico; A, un agente formador de complejos, y A - A, un agente quelatador.

Algunas de las propiedades físicas y químicas de los quelatos metálicos se asemejan a las de los complejos simples y presentan diferencias únicamente cualitativas; otras no obstante, son fundamentalmente diferentes y, por tanto, los quelatos se considerarán como una clase específica de

La industria fue la primera en reconocer la importancia de la quelación y más tarde la biología. Recordemos que las clorofilas, las hemoglobinas, los citocromos, ciertas enzimas, etc., son quelatos específicos de los que dependen procesos vitales. Del tratamiento con quelatos diversos de oligoelementos puede resultar una nutrición mejorada de las plantas; las

aplicaciones del fenómeno de quelación en el campo de la medicina y de la nutrición animal envuelven también muchas posibilidades interesantes.

Los diferentes tipos de reacción de transhidrogenación se catalizan por enzimas portadores de oligoelementos que, como aclara MAHLER, son metalflavoproteidos en las que aparecen quelatos metálicos de la riboflavina como portadores de electrones. También son quelatos los enzimas piridinproteídicas que requieren la participación de un elemento químico, y las cuproenzimas, tales como las típicas fenolasas. A esto hay que añadir, entre otras, las transelectronasas aerobias y anaerobias, como los citocromos y la citocromoxidasa. El hierro y el molibdeno son los elementos más importantes de los metaloflavoproteidos; el cinc es el único oligoelemento envuelto en la catálisis piridinoproteídica; el cobre es parte integral, única demostrable, del centro activo de los enzimas cuproproteínicos.

A pesar de la diversidad de los sistemas, ciertas características unificadoras han empezado a surgir. El oligoelemento, por quelación, o formando un complejo con el proteido, el oxidante y el reductor, es capaz de unir los participantes de la reacción en la superficie catalítica en una configuración rígida, estéricamente determinada y altamente activa.

Los compuestos quelantes difieren mucho en su afinidad para los distintos metales. Una propiedad fundamental de la mayoría de ellos es que un ión libre que tenga una constante de estabilidad alta para el quelante, desplazará el metal quelatado que la tenga más baja.

Los quelatos se pueden formar, pues, con casi todos los metales del sistema periódico. Aunque el número de agentes quelantes y originadores de complejos conocidos es muy grande, los átomos donadores que experimentan la unión con el metal quedan restringidos a los elementos fuertemente no-metálicos de los grupos V y VI; de éstos, el N, O y S son los únicos ejemplos comunes. Los compuestos covalentes, en los que un metal está directamente unido a un carbono, se llaman compuestos organometálicos y tienen propiedades que les diferencian ampliamente de los complejos y de los quelatos.

Como vemos, entre los metales sensibles a la formación de quelatos se encuentran aquellos que tienen significado bioquímico, que son oligoelementos, como Fe, Co, Mn, Cu, Zn, etc. e imprescindibles para las operaciones normales de la célula. Estos elementos químicos ejercen, en la mayoría de los casos, sus efectos en forma combinada. La química de los complejos metálicos es, en sí misma, valga la redundancia, *compleja*; esto es, complicada.

Los iones metálicos en solución acuosa se comparan con los iones de hidrógeno como catalizadores de la hidrólisis de diversos compuestos orgánicos. Las cualidades catalíticas generales de los quelatos en solución pueden clasificarse como reacciones en las que éstos se forman entre el ión metálico y el compuesto que sufre el cambio químico, o con el oligoelemento "transportado" por el agente quelante. De acuerdo con MARTELL, las reacciones del primer tipo implican la lisis de pequeñas moléculas, y ejemplos de esta catálisis son la hidrólisis de los quelatos metálicos de varias bases de SCHIFF, formadas de piridoxal y distintos aminoácidos y polipéptidos; el compuesto de quelación se destruye o se altera grandemente en la reacción. La mayor parte de las reacciones del segundo tipo son enzimáticas, y así ocurre en la hidrólisis de la leucilglicocola por el magnesio o el manganeso; el papel del quelato parece ser, aquí, el mantenimiento del oligoelemento, en forma soluble, activo a un pH más alto del que sería posible en su ausencia.

Un cierto número de aniones, que se presentan comúnmente en los sistemas acuosos disolventes de las plantas y animales y también en los suelos, originan quelatos estables y solubles de oligoelementos. Entre estos reactivos pueden citarse los citratos, tartratos, malatos y variados monopeptidos.

Los quelatos pueden considerarse como una subdivisión del amplio grupo de compuestos de coordinación estudiados por WERNER y tipificados por la presencia de los llamados enlaces de coordinación, los cuales surgen del reparto de un par de electrones entre el ión o átomo de un metal y un átomo o ión de la estructura que forma complejo.

Cuando la molécula del ligador contiene dos grupos donantes de electrones se clasifica como "bidentada" y puede formar un solo anillo: si contiene tres grupos es "tridentada" y puede dar lugar a dos anillos entrelazados condicionados a orientaciones espaciales adecuadas. En algunas estructuras "polidentadas", como las porfirinas, se originan múltiples sistemas anulares y la estructura resultante, insiste CHENOWETH en que posee, en general, una sorprendente estabilidad.

La formación de un anillo de quelación confiere propiedades especiales, tanto al elemento químico quelatado como al ligador, que afectan al color, solubilidad, reactividad química, función catalítica, estabilidad, actividad óptica, etc., del mayor interés biológico.

Respecto a los anillos heterocíclicos que pueden originarse no parece comprobado que existan anillos de tres miembros; en cambio, los de cuatro son bien conocidos y los de cinco suelen ser frecuentes y estables, preferentemente si son saturados. Los anillos de seis miembros son normalmente muy estables, si contienen dos enlaces dobles. Los anillos de cinco o seis átomos poseen aproximadamente la misma estabilidad si contienen un solo enlace desaturado. A partir de siete, ocho y nueve miembros, informa DIEHL que hay una preferencia a la formación de dímeros o polímeros.

Un grupo de ligadores pueden teóricamente enlazarse con cualquier aceptor de electrones y, por tanto, cabe que el ión hidrógeno sea el que se una en lugar de un catión metálico. Como la potencia básica de un grupo donante de electrones mide su capacidad de ligar el protón, ésta puede contribuir también a la unión del ligador con el catión metálico.

De los impedimentos estéricos, como el choque de grupos sobre dos ligadores coordinados, resulta una distorsión de los ángulos del enlace y una disminución de estabilidad, fenómeno en que se basa la obtención de algunos reactivos analíticos selectivos.

El ángulo interno de un anillo quelatado de cinco miembros debe aproximarse a los  $108^\circ$ , pero si es un núcleo aromático, con un ángulo externo obtuso, pierde la propiedad quelatizante. Los metales de transición son los que más fuertemente se quelatizan porque sus capas de electrones internas no están completas y permiten que éstos se desplacen para satisfacer las necesidades quelantes óptimas; otros son más rígidos en lo que se refiere a su capacidad de aceptar o ceder electrones.

Las dos determinantes destacadas en la formación de un quelato son: El pH de la solución, que determina la ionización del ligador, y la constante de estabilidad, que expresa la tenacidad de los enlaces individuales. Las energías de los enlaces son absolutos esencialmente inmutables.

En la formación fisiológica de los quelatos influyen las concentraciones del elemento químico o de los ligadores. Los yestigos de un ligador pocleroso en competencia *in vitro* con otro más débil, pero presente en cantidades relativamente grandes, será menos eficaz de lo que apriorísticamente podría suponerse.

Hay tendencia en los oligoelementos a establecer un orden de estabilidad descendiente, generalmente más o menos igual para cada ligador. IRVING y WILLIAMS han indicado que la afinidad relativa de los cationes bivalentes de la primera serie de transición es como sigue:  $Zn < Mn < Fe < Co < Ni < Cu$ , sin tener en cuenta la naturaleza de los ligadores coordinados o números de los implicados. CHAPMAN apunta que esta serie ya muy paralela a la de electronegatividad. La secuencia conseguida por MELLOR y MALEY con complejos de salicilaldehído se ha citado profusamente y el orden en la estabilidad de los quelatos es:  $Pb^{2+} < Cu^{2+} < Ni^{2+} < Co^{2+} < Co^{2+} < Fe^{2+} < Mg^{2+}$ ; incluye, como vemos, metales electrónicamente no similares, como  $Pb^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , lo que es motivo suficiente para que no tenga la aplicación universal de la propuesta por IRVING Y WILLIAMS. En resumidas cuentas, la trascendencia biológica se concentra en aquellos ligadores, poco corrientes, que son capaces de formar quelatos con sólo uno o algunos de los elementos químicos biológica o toxicológicamente importantes

A la interacción de cationes con los iones carboxilato de los aminoácidos y proteidos debe añadirse la posibilidad de que, con estos diversos iones de metales pesados ( $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , etc.), forman quelatos. Así el ión glicolato forma un quelato con el ión cúprico. La histidina es de interés especial a este respecto, ya que forma un quelato extremadamente estable con el ión cobaltoso; el grupo imidazólico de la histidina también quelatiza los iones  $Zn^{2+}$  con facilidad.

Según DATTA, LEVERMAN y RABIN, los valores publicados sobre las constantes de estabilidad del sistema histidina-cobre requieren ciertas modificaciones, ya que presentan una serie de anomalías debidas probablemente a una variación con el pH de las especies quelantes; éstas van asociadas, al parecer a la presencia de un grupo carboxílico en la molécula.

La quelación es un procedimiento de solubilización de los complejos metal-aniónicos según un mecanismo totalmente diferente del de la disolución por interacción iónica. Los complejos cálcicos prácticamente insolubles en los ácidos minerales se les puede disolver en ácido cítrico, a pesar de ser mucho más débil que cualquier ácido inorgánico porque éste actúa como un poderoso quelatizante a causa de su afinidad esteroquímica particular para los cationes, que forman parte del complejo a disolver, el anión quelante los coge como lo hace una pinza. JOHNSTON ha determinado experimentalmente el índice de quelación (I. Q.) con respecto al calcio, de numerosos aniones inorgánicos: las variaciones del índice para ácidos orgánicos dicarboxílicos son: ácido succínico (dos grupos COOH sin grupo OH), 22 por 100; ácido málico (dos grupos COOH con grupo OH), 51,2 por 100.

Conocemos numerosos quelatos cálcicos que no son ni ácidos ni sales neutras de ácidos orgánicos. La introducción de un hidroxilo aumenta el índice de quelación, pero en medida menor que la de un grupo aminado. Es por lo que numerosos aminoácidos ciertos compuestos de síntesis, ácidos orgánicos aminados y sobre todo los polielectrolitos naturales son poderosos quelantes cálcicos.

Los quelatos pueden ser naturales o artificiales. Entre los primeros tenemos las hemoglobinas que poseen en su grupo prostético incluido el átomo de hierro en la



tetrametildivinildipropanoicoporfina. También en las clorofilas existen agentes quelantes porfirínicos: las feoporfirinas que fijan el magnesio. De tipo semejante serían las cobalaminas o vitaminas B<sub>12</sub> con cobalto los enzimas ya citados etc.

Un grupo especial de agentes queladores artificiales o de síntesis son los denominados comercialmente complexotas. Son una serie de compuestos orgánicos poliaminocarboxílicos capaces de originar, principalmente, quelatos metálicos solubles con iones polivalentes alcalinotérreos. La denominación de *complexona* fue propuesta por SCHWARZENBACH, pero ya antes se conocían en Alemania con el nombre de *trilonas* y en Francia por *celonas*. Los principales son: *el trilón A* o *complexona I*, que es la sal trisódica del ácido nitrilotriacético; *el trilón B* o *complexona II*, que es la sal tetrasódica del ácido etilendiaminotetracético o *edta*, y la *complexona III*, que es la sal disódica de este mismo ácido.

De entre todos ellos el más popular y de mayor interés general es el edta conocido en el mercado con numerosos nombres: ácido tetracémico, verseno, sequestreno, edatamil; mullapon, calcioedta, kelantreno, tetralón B, permakleet, RN-water sofftener, complexona, etc. Además de los metales de transición, otros muchos tienen para él grandes afinidades: berilio, ión crómico, ión férrico, lantano, plata, plomo, titanio, vanadio y muchas tierras raras. Como no se metaboliza y, al parecer, penetra en las células, proporciona un medio de suprimir del cuerpo los iones solubles por el orden de sus constantes de estabilidad. Si se quiere eliminar un oligoelemento, le acompañarán los elementos normales con arreglo a la cantidad relativa y a la constante de estabilidad de cada uno; así, por ejemplo, el edta no es específico para el plomo -uso muy popularizado actualmente-, pues capta otros iones que tienen una constante más alta, como el cobre, el níquel y especialmente el ión férrico. El ácido aurintricarboxílico es un quelante fuerte para el berilio in vitro in vivo.

El 2,3 dimercaptopropanol, dimercaprol, *bal*, X217 ó *britishanti lewisita* es un ditiol de cadena recta, que fija los siguientes elementos químicos formando quelatos: antimonio, arsénico, bismuto, cadmio, cobre, cromo, mercurio, níquel, oro, plomo y cinc; se forman complejos de sustitución en los sulfhidrilos que, en caso del cadmio por lo menos, se disocian en el riñón y pueden producir nefritis.

A continuación recogemos algunos de los agentes quelantes, cuyo uso en Biología comienza prácticamente en la actualidad. tales como: *Analgésicos* y *antitérmicos* (aminopirina, antipirina, fenacetilurea, fenilbutazona, etc.); *antibióticos* y *quimioterápicos* (ácido p-aminosalicílico, cloranfenicol, estreptomocina, isoniacida, penicilina, sulfamidas, tiosemicarbazona, etc.); *antitiroideos* (ácido p-aminobenzoico, 2-aminotiazol, 2-mercaptomidazol, tiourea, tiuracilo, 1-5-vinil-2-tioxazolidina, etc.); *medicamentos con grupos específicos* (carbazida, diazimi, hidantoína, hidralazina, monopéptidos, nitritos, piridina, pirocatequina, quinaldina, tiazol, , tiocianato, tiol o mercaptano, etc.); quelantes típicos para eliminar metales (ácido cítrico, edta, bal, versenol o sal trisódica del ácido N-hidro-xietilen -diamino-triacético, etc.); sustancias químicas diversas (ácido 2-cetoglucónico, ácido fítico, ácido rubeánico y derivados, adipoína, carbonato de guanidina, cupferrona, difenilcarbazida, difenitiocarbozona, dimetilglioxina, etilxantato potásico, galatos, glicerofosfatos, gluconatos, oxina, tiocarbamato potásico, urácilos, etc.), y otros distintos productos, tales como la acetazolamida, la adrenalina, el dietiltiocarbamildisulfuro, la cortisona, etc, etc.

Los sistemas amortiguadores empleados para controlar el pH *in Vitro* han servido también para regular la concentración de los cationes. El concepto de pM –donde M representa concentración de iones de metal– es el equivalente de pH y se ha propuesto recientemente. Son bastantes las diferencias en las respuestas de los sistemas para una misma concentración de hidrogeniones, lo que refleja la capacidad ligadora del elemento químico a los distintos amortiguadores de iones de hidrógeno corrientes en el laboratorio. El uso de un tampón de fosfato produce efectos muy distintos a los de bicarbonato o a los de la glicilglicocola; facilita este sencillísimo dipéptido un pH conveniente y su potencia delante para el cinc y cadmio, aun siendo menor que el de la glicocola sola, es todavía tal que causa una ionización efectiva muy baja de los metales pesados. Es, sin embargo, susceptible al ataque por parte de una dipeptidasa activada con oligoelementos presentes en los preparados crudos celulares. El amonotrishidroximetilmetano o tris es un amortiguador útil que no controla el pM, a un pH de 7 a 8, en grado mayor que el amoníaco, un grado que es para muchos propósitos insignificante y, desde luego, siempre preferible al de los citratos y fosfatos. Es práctico adicionar mínimas cantidades de quelantes, resistentes al ataque enzimático, a los sistemas amortiguadores corrientes.

Algunos ejemplos de la literatura científica pueden servir para hacer hincapié en la conveniencia del control del pM junto con el pH. Así en una serie de estudios con espermatozoos de erizo de mar se ha observado que los monopéptidos, o el amoníaco, prolongan su capacidad fertilizante mejor que los proteidos. Al amoníaco se le achacaba un efecto metabólico, ya que determina que ciertos aminoácidos, como glicocola, alanina e histidina, no fueron utilizados; pero posteriormente, se hizo evidente que una gran variedad de agentes quelantes ejercen este efecto simplemente por medio de la secuestración de oligoelementos del agua del mar.

La utilidad de los quelatos metálicos en varias ramas de la química teórica y aplicada y en los campos afines es generalmente reconocida. Algunas de sus aplicaciones prácticas son tradicionales en las ciencias biológicas; por ejemplo: en la solución de BENEDICT o en el uso de citrato para prevenir la coagulación sanguínea. La clorofila, los pigmentos sanguíneos y los citocromos, etc., repetimos que son quelatos especiales indispensables para los procesos vitales. Los reactivos que forman quelatos metálicos se emplean frecuentemente en los análisis cuantitativos. La dimetilglioxima, 8-hidroxiquinolina, cupferron, solución de FEHLING, o-fenantrolina y aluminón son ejemplos de sustancias indispensables en las separaciones analíticas y precipitaciones. La teoría de la quelación ha proporcionado una base para nuevos desarrollos en el campo de las lacas de color, tales como las de alizarina y las de cromo de los compuestos o-o-dihidroxi-azo. En bioquímica la reacción del biuret, las sales de aminoácidos de los metales pesados y los productos medicinales de las series del pirocatecol, son ejemplos de la utilidad de los compuestos quelatados. Los pigmentos quelatos, cuales las ftalocianinas, son actualmente muy empleados.

En años recientes se ha extendido extraordinariamente el uso de ácidos aminopolicarboxílicos, que tienen la especial propiedad de formar quelatos solubles en agua. Estas interesantes sustancias, de las más importantes de las cuales son, insistimos, las sales alcalinas del ácido etilendiaminotetracético o *edta* y de los fosfatos condensados, se fabrican en grandes cantidades y se emplean, cuando es conveniente, en la separación de los iones metálicos, catálisis negativa, clarificación

de soluciones, y lo que es para nosotros más, sugestivo, con fines farmacológicos y terapéuticos.

Los acetilacetatos son complejos cíclicos de inestimable valor en la purificación de los metales, debido a su gran volatilidad y solubilidad en los disolventes no polares. Asimismo es de particular utilidad en la separación de los metales radioactivos el empleo de los agentes quelantes, en relación con las resinas de cambio catiónico y en la extracción con disolventes.

Interesantes análisis biológicos de oligoelementos pueden llevarse a cabo con ayuda de los formadores de quelatos, así por ejemplo: las determinaciones volumétricas de Ba, Zn, Cd, Hg y Fe, etc.

En general, los agentes quelantes se pueden dividir en dos clases, que dependen de si forman quelatos metálicos que precipitan o son extraíbles por disolventes orgánicos. Los primeros son vulgarmente llamados agentes secuestrantes y se emplean para muchos propósitos en solución acuosa. Los quelatos de la segunda clase se usan principalmente para extracciones o para análisis.

Han pasado menos de una decena de años desde que SCHWARZENBACH y BIEDERMANN sorprendieron al mundo, analítico con su determinación volumétrica del calcio y magnesio. Como se sabe bien, ésta se basaba en el uso de una solución tipo del conocido, hoy, como *edta* y se estableció así una nueva rama de análisis volumétricos: la complexometría., El grado de desarrollo que ha experimentado esta técnica no tiene paralelo en la historia de la química analítica, a la que aplica PRIBRIL el título más adecuado de *quelatometría*. Prácticamente todos los oligoelementos del sistema periódico entran dentro del marco de este método, altamente elegante, excepto unos pocos elementos de los grupos primero, quinto y sexto y el berilio, boro y silicio. La meta principal de la quelatometría, actualmente, es encontrar caminos y medios de llevar a cabo las titulaciones con la máxima selectividad y rapidez.

En quelatometría se aplican los colorantes solubles con propiedades de indicadores de pH. BELC HER ha ensayado una gran serie de indicadores quelatométricos entre los que figuran colorantes azohidroxi, compuestos con grupos hidroxílicos fenólicos, derivados de las ftaleínas, etcétera. RAHEEN y AMNAL han empleado en este respecto el eriocromo azul S. E.

El tolueno 3,4-ditioil se maneja ampliamente como reactivo para: el estaño, tungsteno y molibdeno. Más recientemente se ha demostrado también su sensibilidad y alta selectividad para otros oligoelementos, como el cobalto, cobre, talio, antimonio, arsénico, germanio, etc., dando compuestos coloreados. Se han puesto a punto una serie de nuevos métodos analíticos con este nuevo y versátil agente quelante, y los trabajos fundamentales en este campo se deben a CLARK.

Un procedimiento excelente para la búsqueda histoquímica del calcio en los tejidos consiste en la formación de un quelato soluble (murexida) que da un color rojo naranja que no es interferido por otros metales, como el hierro y el cobre.

La estabilización farmacéutica de medicamentos, como vitaminas, y de cosméticos, la potenciación de la adrenalina, la conservación de alimentos, el desendurecimiento de las aguas, el fraccionamiento de proteidos mediante la formación de sales sódicas, etc., son otras de las múltiples aplicaciones de la quelación en el campo de la biología, farmacia, medicina, veterinaria; agricultura y farmacología.

El fenómeno de quelación puede tener especiales aplicaciones médicas, que reseñaremos con más detalle ulteriormente, tales como la acción antianémica, hipotensora, antifúngica, bactericida, etc., etc.

Para evitar la necrobiosis y los fenómenos autolíticos de las células del sedimento del líquido ascítico o de frotos vaginales, PALO ha probado la quelatización. SLATER y CLELAND conservan los sarcomas de los músculos aislados bloqueando con unas gotas de un agente quelatador los sistemas oxidativos. HOLTER, WEBER, OTTESEM. BRAIRATI y LEHMAN, de análoga manera, han mejorado la demostración citológicoeléctrica de los microsomas.

BERMEJO MARTÍNEZ ha redactado una completa revisión sobre los agentes quelantes de mayor importancia comercial y en ella describe sus aplicaciones como coadyuvantes de los detergentes sintéticos y conservadores de jabones. Cita también numerosos usos en cosmética, industrias de la alimentación, limpieza de metales, reparación de productos inorgánicos y otros.

### QUELACIÓN, OLIGOELEMENTOS Y ANIMALES

En los sistemas bioquímicos de los seres animales, a pH fisiológico, los iones de los oligoelementos no se presentan libres, en general, excepto en concentraciones muy bajas, pero pueden disolverse en cierto grado mediante los agentes quelantes naturales. Se sabe que la mayoría de los iones metálicos se combinan rápidamente con las proteínas y se transportan, en forma coloidal, como parte de un complejo metal-proteido. En ciertos casos los metales se adsorben en el hueso, que actúa como reserva de intercambio de iones. Algunos oligoelementos, como el hierro, en las hemoglobinas y citocromos, y el cobalto en las cobalaminas, están tan firmemente ligados que no pueden intercambiarse con otros portadores de elementos químicos.

Es evidente que las plantas sanas con cantidades adecuadas de oligoelementos, facilitan cosechas de pienso más completas y satisfactorias para los animales. A parte de este aspecto de los quelatos en la nutrición animal, resta la posibilidad de su introducción directa en los piensos o en el agua bebida. Aunque los experimentos en este campo son todavía fragmentarios, y en cierto modo incipientes, sabemos por RUBIN que la adición de los quelatos al forraje aumenta su eficacia y supera a la obtenida con sales inorgánicas.

El manganeso es capaz de formar quelatos con numerosas sustancias que se encuentran naturalmente en el cuerpo. Si se quelatiza antes de su administración, puede establecer competencia con los "ligandos" corpóreos que dan una medida de la fuerza de enlace fisiológica. MAYNARD y FINK a este respecto, han comparado la excreción del manganeso iónico y del quelatado. Cuando se inyecta intravenosamente en animales de experimentación el manganeso radioactivo pasa rápidamente de la sangre a distribuirse en los diversos tejidos del cuerpo, especialmente hígado, páncreas y riñón; dentro de la célula hepática se concentra en las mitocondrias. La excreción es casi enteramente fecal, pero también parte se elimina por la bilis.

No parece pertinente hacer responsable total, al quelato, de una acción biológica en un momento dado. Una sustancia quelante se inactiva por ligeras modificaciones de sus moléculas y su efecto se puede aumentar o disminuir si se administra combinada a un oligoelemento.

La constante de estabilidad de un quelato no quiere decir siempre que el metal sea el más importante bioquímicamente. Así los quelatos de oxina con níquel son más estables que con hierro y, sin embargo, este último es el funcional. Las cualidades quelatizantes de una sustancia observada *in vitro* no es el único factor que sirve para pronosticar su efecto, ya que puede haber influencias del resto de la molécula, impedimento estérico para la sujeción del metal *in vivo*, etc.

Si se recuerda que la mayor parte de los procesos vitales exigen la presencia de oligoelementos como activadores de enzimas, se puede uno dar cuenta de la importancia que pueden tener tales investigaciones teóricas referentes a la mayor o menor capacidad de una sustancia para contraer una unión heterocíclica con un ión metálico, formando lo que se llama el anillo quelatado.

No entraremos en detalles sobre las explicaciones que se han emitido a este propósito, si bien recordamos que en determinadas reacciones el ión metálico parece estabilizar, por sus propiedades electrostáticas los productos intermediarios activados, al mismo tiempo que cataliza en los desplazamientos de carga. En la mayor parte de los casos parece que se forma un complejo ternario: sustrato-metal-enzima; se trataría, muy groseramente, de una especie de quelato doble, en la que las constantes de unión del sustrato al metal y del metal al enzima no son muy diferentes, ya que si el oligoelemento está unido demasiado fuertemente se inactiva al fermento. Este hecho se puede comparar al bloqueo de enzimas, cuyo grupo activo es un -SH, por metales y su restauración *a posteriori* añadiendo al medio un quelatador que se una más firmemente que el fermento mismo.

La misión de los agentes quelantes semeja más decisiva si los consideramos como punto de ataque enzimático de los medicamentos. La unión quelatada permitiría un contacto del fármaco y del enzima con la creación de “un complejo ternario” (medicamento-metal-enzima) análogo al que puede originar el fermento con el sustrato natural. Sin embargo, como ha afirmado (SCHUBERT) no es ésta la única función posible de los agentes quelantes.

La actividad muy alta de la histidina o cisteína en un fenómeno dado sugiere que en la secuestación por quelación está la raíz del fenómeno. STABHELIN ha logrado duplicar el efecto *in vitro* de la tiroxina por medio de quelantes. En el caso de los sistemas de enzimas aislados, cuando se han añadido agentes quelantes, aparte de su acción secuestradora, ISAKA e ISHIDA han observado algunas otras. Así el quelato de cobre del ácido fólico acelera el ennegrecimiento de las soluciones dedihydroxofenilalanina o dopa; ciertos quelatadores inhiben la tripsina, ya que es activada por el calcio y el cobalto; por el contrario, la hialuronidasa es interferida por el hierro y el cobre, acción que impedirían los agentes quelantes, y las soluciones acuosas de este enzima pueden estabilizarse, con arreglo a lo propuesto por SINGHER y LOWRY, por adición de compuestos capaces de formar con metales pesados complejos, probablemente quelatos, dotados de alta estabilidad. También los quelatadores, al igual que el manganeso, incrementan y aceleran la incorporación del acetato marcado con carbono catorce en la síntesis hepática del colesterol; que el vanadio, en cambio, impide.

La literatura bioquímica está repleta de otros ejemplos genuinamente catalíticos que implican a: los agentes quelantes. Tales muestras sutiles podrían ser el hierro, el factor de difusión sintético del ácido dihidroximaleico descrito por DAUBERMERKL, o un quelato de cobalto-histidina que aumenta la supervivencia de las ratas. Por otra parte, la metionina es capaz de retener el cobre, y el ácido

adenosintrifosfórico, o ATP, puede actuar en sistemas enzimáticos como fijador de calcio interfiriendo procesos biológicos. Existe además la posibilidad de que ciertos oligoelementos formen con el ácido adenosintrifosfórico, o ATP, un quelato, conectando así los dos extremos de la molécula; el elemento metálico servirá de puente, a través del cual pasarían los electrones del fosfato a la base púrica, formándose un sistema electrónico único, con los electrones comunes, no localizados, que pueden transportar energía; esto puede admitirse, según MAYOR, basándose en la fuerte analogía existente entre la inopina y la oxiquinolina, cuya estructuración quelante es bien conocida. Según KELLER, un quelato de cinc de un oligopéptido parece ser el coenzima de la carboanhidrasa.

Todos los tejidos mineralizados, como los de huesos y dientes, poseen un componente esencial orgánico-inorgánico y un complejo fibrilocrystalizado revestido de la sustancia fundamental. La asociación fibrilometálica misma es un caso de quelación, puesto que las cadenas laterales de las fibrillas polipeptídicas están unidas a los cationes superficiales de la red mineralógica por enlaces heteropolares. De este hecho se deduce que la disgregación total de un tejido mineralizado, sea por resorción, cavitación o erosión, plantea siempre dos problemas: uno, el de la escisión del complejo en sus dos componentes, y otro, la destrucción físico-química de las fracciones previamente aisladas.

Siendo la quelación una propiedad específicamente aniónica, ciertos ácidos orgánicos, como el cítrico, succínico, málico y tartárico, presentan una particularidad extremadamente importante. Sus sales neutras-a condición de que los cationes salinos sean monovalentes- son, en efecto, quelantes tan poderosos como los ácidos de los que derivan. No es entonces necesario que la placa consiga la acidez crítica y la reacción quelante destructora puede, según LEINGRÜBER, efectuarse fácilmente en el diente al pH salino normal. Los quelatos van adquiriendo importancia, no sólo para la patogenia, sino para la profilaxis de la carie dental; puesto que si ellos constituyen excelentes fijadores de los cationes cristalizados, con más razón quelarán los cationes cariogénicos, lo que equivale a hacerlos inofensivos. Los protones y cationes tri y polivalentes deben de ser considerados como la causa directa, tanto de la susceptibilidad del diente (potencial de absorción patológica) como de la irresistencia tisular (ruptura de las uniones fibrilo-minerales). Las masillas, a base de óxido de cinc y eugenol, que se utilizan para llenar cavidades dentales profundas, parece ser que forman quelatos que absorben cualquier material y originan una masa dura estable que obra como sustancia intercelular.

Es muy probable que el carácter quelatizado de las uniones fibrilo-cristalizadas en los tejidos mineralizados permitirá, por fin, dilucidar la estructura biológica de estos tejidos, tanto más cuanto que su aparente inercia resulta de la estabilización recíproca de las fibrillas y de los cristalitos por intermedio de las valencias y covalencias quelantes. Es verosímil admitir que el concepto de quelación facilitará el precisar la función del ácido cítrico, y de sus precursores o de sus sucesores, en todos los tejidos mineralizados, y contribuirá al conocimiento de los factores locales de la osificación.

La difenilditiocarbazona o ditizona, molécula azufrada que forma quelato, daña las células beta de los islotes pancreáticos y producen los síntomas de la diabetes *mellitus* clásica. Es instructivo el estudio de WOLF, MASKE, STAMPFL y BAUMGARTEN, quienes, después de inyectar ditizona, observan un aumento de

los niveles de cinc sérico en perros. Un examen histológico demuestra lesiones en las células de los islotes y los ensayos histoquímicos indican una pérdida del oligoelemento paralela a la dosificación en este reactivo analítico. El cinc en el *tapetum lucidum*, membrana de reflexión de los ojos de los carnívoros, es particularmente accesible a la ditizona.

La 8-hidroxiquinolina u oxina es una sustancia quelante también inductora de diabetes *mellitas*, particularmente en los conejos. MUSASHI y NAITO han comprobado que derivados como la 8-metoxiquinolona, que no delatan en condiciones fisiológicas, carecen de actividad como agentes diabetógenos. ROOT y CHEN, KADOTA y ABE e IWAMOTO y ADAMS han señalado igualmente que la presencia o ausencia del efecto diabetógeno corre pareja con la capacidad de varios análogos para formar quelatos.

Pocas hormonas son más inestables que la adrenalina, incluyendo la oxidación por metales en general, y especialmente el cobre, con el que forma un complejo altamente oxidable. Su quelación puede ocurrir con el boro, estabilizándose sin alterar su potencia farmacodinámica; el quelato ferroso es, asimismo, activo. CLARK y GEISMAN han demostrado inequívocamente que la potenciación o prolongación de las acciones de la adrenalina sobre el intestino aislado mediante compuestos flavonoides “similares a la vitamina P” son el resultado de la quelación del cobre por estos heterósidos. Además la 8-hidroxiquinolina y el dietilditiocarbamato, que son secuestrantes poderosos de ese metal, también activan el sistema. Pronosticaron que la 3,3',4'-trihidroxi flavona formaría un quelato estable en mayor grado y, por tanto, sería muy eficaz, lo que se ha confirmado. La 2',3',4'-trihidroxi chalcona resultó también ser más eficiente que la buteína, de la que se distingue únicamente por la ausencia de un grupo hidroxilo no quelatogénico. Existen grandes diferencias de efecto en pares de compuestos con funciones ligadoras idénticas, pero distintos en cuanto a solubilidad: gossipina y quercetina, rutina y xantorhamnetina, etc. El compuesto de mayor solubilidad tiene la mínima actividad, y esto sugiere que hay que desolubilizar el cobre, antes que secuestrar simplemente, para la protección máxima de 1ª hormona medular suprarrenal. Es posible que en las reacciones de las flavonas con oligoelementos esté la clave de la interpretación de su función biológica y que, con arreglo a las manifestaciones de sus quelatos, sean importantes bioquímicamente (SZENT GYÖRGY, CHENG, YODER, SROTY Y BURROUGHS Y MOEWUS).

Se han descrito deficiencias vitamínicas como resultante de envenenamientos metálicos. El efecto hipotiróideo del cloruro de cobalto puede ser debido a su reacción con la hormona tiroidea. Durante el envenenamiento con cromo se produce una anemia perniciosa refractaria a la vitamina B<sub>12</sub> y se ha sugerido se deba a una sustitución del cobalto en su molécula. La eficacia de las sales de circonio en el tratamiento de la dermatitis del *rhus toxicodendron* se achaca a la quelación de aquel metal por la toxina, probablemente a través de los grupos catecólicos presentes en el urushiol.

El transporte plasmático del hierro, cobre y probablemente de otros oligoelementos ocurre, según la opinión general, a través de la mediación de proteidos especiales como la transferrina, ceruloplasmina, etc. WARNER distingue, entre ciertas de éstas, que son coordinaciones con un solo grupo funcional, y aquéllas, que son quelatos legítimos.

DYCKERHOFF, MARX y LUDWIG fueron los primeros en investigar el efecto anticoagulante de ciertos quelatadores basado en su poder fijador del calcio. Son varias veces más activos que los citratos alcalinos y menos agresivos para los elementos formes de la sangre, permitiendo así su empleo en el recuento de hematíes y leucocitos, incluso pasados varios días si la sangre se guarda a baja temperatura. Como fármaco anticoagulante no se pueden emplear *in vivo* puesto que originan una depredación del calcio que llevaría antes que nada a una crisis de tetania.

En los estudios de BODINE y FITZGERALD, sobre el efecto de los reactivos de cobre en embriones de saltamontes, fue posible extraer el quelato con el dietilditiocarbamato de ese oligoelemento o *detda*. Es posible que en el proceso de análisis los iones de cobre se liberan del tejido y reaccionen entonces con el reactivo, más bien que durante la vida celular. Los quelatos de cobre, son como indica RUBIN, varias veces más eficaces en el perro que sus sales.

CRESCITELLI ha comunicado una correlación negativa para el efecto de la oxina y otros agentes quelatadores relacionados sobre la transmisión nerviosa.

Podría parecer que el uso persistente de los agentes quelantes representaría unas pérdidas indeseables de los oligoelementos de las células. Es, sin embargo, sorprendente que sea tan poca la interferencia, quizá porque los metales en los alimentos ya están firmemente quelatados, o porque *in situ* se aíslan bien en la estructura celular. El cinc de tejido del islote pancreático es más sensible que otros metales corpóreos, puesto que se han citado pérdidas del mismo en seres humanos y en roedores.

Las correlaciones negativas de estructura-actividad pueden negar la probabilidad de

que la quelación sea el acontecimiento crítico. La quelación entre el oxígeno carbonílico

en posición seis y el hidrógeno reactivo en posición nueve no puede ocurrir en la cafeína.

a pesar de que la teofilina quelatiza el cobre. HARDMAN sus colaboradores exponen que la cafeína es sólo un poco más débil que la teofilina para estimular el preparado hipodinámico

corazón-pulmón, y que la 6-desoxiteofilina es también bastante potente, lo que hace innecesaria toda otra consideración en conexión con la quelación entre las posiciones seis y nueve en esta serie.

La base de ciertas acciones farmacológicas debe estar en el transporte de cationes inorgánicos a través de las membranas celulares en forma de quelatos, y WILLBRANDT ha explicado cinéticamente el problema. La comparación de datos experimentales acerca del efecto de la histamina sobre intestino aislado, y de los heterósidos cardíacos en el transporte de iones en el glóbulo rojo, lleva a: admitir que la amina biógena actúa como un transportador de sodio interfiriendo en el proceso el calcio. Los antihistamínicos obran como rivales de la histamina o de los quelatos histamínicos y los glucósidos cardiotópicos ejercen una acción competidora de los quelatos formados, presumiblemente, por corticosteroides.

La modificación de los proteidos solubles con ácidos halogenados, por ejemplo, produce un notable aumento de su poder quelatizante. que PERKINS supone puede



rascender y provocar una gran eliminación de oligoelementos del organismo animal.

De un importante y reciente avance en el control de los iones metálicos en sistemas biológicos han informado POPOVICI, GESCHICKTER, REINOVSKY y RUBIN, los cuales regulan los niveles de calcio del suero *in vivo* mediante quelatadores. La administración intravenosa del agente quelante produce una rápida caída del nivel de la calcemia y consecuentemente la muerte por tétanos, pero la del quelato de calcio no ejerce

ningún efecto. También se ha visto que la proporción del calcio sanguíneo se puede disminuir y mantener, controlando la proporción y, dosificación del agente quelante. De este modo, la separación del calcio iónico del suero se equilibra por reemplazamiento de las reservas móviles del animal. La velocidad de descenso del calcio sanguíneo depende del método de administración y se afecta el orden de disminución de las velocidades por los siguientes métodos: intravenoso > intraperitoneal > intramuscular > subcutáneo > percutáneo.

Los resultados de estos experimentos han dado también prueba directa de la acción reguladora del ión magnesio sobre la calcemia, puesto que la administración simultánea de aquel elemento y una dosis letal de quelador originan una recuperación rápida del nivel de calcio. Se ha comprobado que no es debido a la formación de un quelato de magnesio más que de calcio y esta conclusión se apoya en el hecho de que los quelatos de este segundo metal alcalinotérreo tienen una constante de estabilidad mayor que los del primero.

El control de las concentraciones del calcio en el cuerpo y su separación, y la del hierro por formación de quelatos, sugiere el empleo de los agentes quelantes para la eliminación de metales no deseables de los sistemas biológicos. KETY ha investigado el empleo de los citratos para la separación del plomo del cuerpo. Sin embargo, el ión citrato presenta la

desventaja de que es metabolizado y, por tanto, destruido: el hecho de que otros no lo sean abona a favor de su empleo. Otra ventaja de estos últimos es que su constante de estabilidad con el plomo es notablemente mayor que la del anión citrato y que la del quelato de calcio. En realidad, existen buenas razones para creer que las constantes de estabilidad de los quelatos de los metales pesados son más altas que las del calcio y que, por tanto, son separados aquellos con preferencia.

## QUELACIÓN, OLIGOELEMENTOS Y VEGETALES

En 1860, SACHS y KNOP demostraron, concluyentemente, que las plantas superiores tenían necesidad fundamental de suelo o materia orgánica. Independientemente ambos investigadores afirmaron que los vegetales podían crecer, satisfactoriamente, con sus raíces sumergidas solamente en agua, con tal que ésta contuviera sales solubles con nitrógeno, hierro, potasio, calcio, magnesio, cloro y azufre. La atmósfera facilitaría el carbono y algo de oxígeno, y el agua el resto de ese elemento químico y el hidrógeno. Dentro de esta lista histórica de diez elementos se considera al hierro como el primer micronutritivo y oligoelemento. Los conocimientos de la esencia química de la vida en general, y en particular de las fanerógamas, permaneció así, estática, hasta principios del siglo actual.

MAZÉ publicó en Francia, en 1914, sus resultados sobre experimentos de cultivos en agua, con los que sancionaba la reivindicación de BERTRAND, en 1905, sobre la esencialidad del manganeso, y anunció la del cinc. Unos años más

tarde propuso, además, que el aluminio, boro, cloro y silicio se considerasen también como elementos indispensables. El gran servicio de este investigador fue indudablemente, el llamar la atención sobre los problemas especiales en la purificación química de los medios de crecimiento de plantas, obvios para el estudio de sus necesidades oligoelementales.

WARRINGTON, entre 1923 y 1927, estableció las necesidades de boro para los tréboles, alfalfa y diversas variedades de judías. El reconocimiento del cinc como elemento imprescindible fué ratificado en 1928 con las pesquisas de SOMMER y LIPMAN en California, sobre alforfón, judías y cebada; en 1932, CHANDLER, HOAGLAND y HIBBARD descubrieron que la enfermedad de la *hoja pequeña* de los árboles frutales era una deficiencia en este oligoelemento; simultáneamente, ALBEN, COLE y LEWIS llegaron a la conclusión de que se debía a la misma causa la alteración patológica denominada pecan rosette.

Por esta época, LIPMAN y MACHINNEY sugirieron que el cobre era un elemento

químico importante para el crecimiento de los vegetales. Hoy sabemos que el exantema

de los frutales corresponde a su carencia (FLOYD, WICKENS, SMITH y THOMAS). Las demostraciones de laboratorio, por un lado, y la corrección de enfermedades del campo, por otro, han servido para popularizar al cobre, dándole un significado agrícola por encima de su carácter fungicida.

HOAGLAND, de la Universidad de California, fue quien primeramente compuso líquidos suplementados con oligoelementos que, en un tiempo u otro, se habían encontrado en plantas. Los elementos químicos incluidos fueron: aluminio, arsénico, bario, bismuto, bromo, cadmio, cobalto, cromo, estaño, estroncio, flúor, litio, mercurio, molibdeno, níquel, plomo, rubidio, selenio, titanio, vanadio, wolframio y yodo. El cloro estaba siempre presente en estas soluciones, ya que los cloruros son fuente de varios de los elementos químicos citados. Este período representó la aurora de una nueva era en el control de los medios de crecimiento de plantas, y fue así posible decir, por medio de ensayos químicos si las soluciones, agua o recipientes eran los adecuados.

La búsqueda de nuevos oligoelementos fué apurada aún más por ARNON, quien llevó a cabo experimentos con un subgrupo de los suplementos de HOAGLAND que poseía molibdeno, titanio, vanadio, cromo, wolframio, cobalto y níquel; sus ensayos con lechugas fueron especialmente significativos, ya que obtuvo rendimientos casi diez veces mayores. La identificación del molibdeno como factor de crecimiento específico fue resultado de los procesos de purificación química: sus soluciones previenen completamente la deficiencia en plantas de tomate. En 1942, ANDERSON, en Australia, demostró que algunos pastos de trébol, en tierra montañosa de baja producción cerca de Adelaida, eran deficitarios en dicho oligoelemento, cuyo efecto principal es capacitar a las bacterias simbióticas en los nódulos en las raíces, para que efectúen su función normal fijadora del nitrógeno atmosférico. La enfermedad *chiptail* de la coliflor es debida así mismo a su carencia en molibdeno, e igualmente el amarilleamiento y enrizamiento de las hojas de col, tomate y avena.

La clorosis férrea es, quizá, la enfermedad deficitaria más corriente en los agrios y muchos otros árboles y plantas, donde el color amarillo de las hojas va seguido de

la muerte de las ramas. Se han comprobado carencias de manganeso en plantas consistentes en la aparición de venas verdes oscuras y caída de hojas nuevas. La deficiencia de cobre en los árboles con frutos cítricos produce una inhibición del crecimiento de sus ramas axilares. La falta de cinc permite el auge de hojas cloróticas y moteadas.

Que exista un equilibrio adecuado de los oligoelementos esenciales es de la mayor importancia. Un exceso del elemento químico puede ser dañino porque previene que otro metal indispensable sea absorbido o lleve a cabo su función normal. Este efecto mutuamente antagónico se ilustra por la toxicidad de cobre en las plantas que opera en sus fases iniciales por desplazamiento del hierro, dando lugar a una clorosis inducida. Similarmente, la *teartness*, una enfermedad en el ganado asociada con un exceso de molibdeno, queda trocada por la administración de cobre.

En estos últimos años se han realizado una cantidad considerable de investigaciones sobre el uso de los quelatos para contrarrestar los síntomas de deficiencia oligoelemental en plantas, recogidas principalmente por REARTL y MERTELL.

Los filtrados de cultivo del *Fusarin oxysporum f. lycopersici* contienen licomarasmina, péptido que causa un marchitado característico de las hojas de tomate; su efecto se acrecienta si se añaden iones ferrosos y se consigue la máxima toxicidad al añadir cantidades equimoleculares de sales de hierro antes del ensayo en plantas. Se ha señalado que debe formarse el quelato de hierro para que la licomarasmina actúe. El cobre, según se cree, origina un quelato más estable e interfiere con la toxicidad de la licomarasmina. En un sistema que contiene una cantidad limitada de hierro, la 8-hidroxiquinolina previene la acción de la licomarasmina, probablemente porque quelata todo el metal.

El albinismo de las plantas, inducido por el agente antifúngico bistriocarbamilhidrazina,

se restaura con el cobre. El ácido fusarínico (ácido 3-butilpiridin-6-carboxílico) ejerce un efecto dañino en las plantas por su capacidad de quelatar el hierro porfirínico de las catalasas. Otros agentes quelantes, como la 8-hidroxiquinolina y el ácido 2-metil-4-piridincarboxílico ejercen efectos similares que se anulan para sus homólogos no quelantes. Un quelato de boro-sacarosa puede ser de importancia en la translocación de dicho diholósido en las plantas: este fenómeno parece ser la única ilustración actual sobre la posible mejora de transporte de sustancias mediante quelación previa.

Las raíces de las plantas segregan pequeñas cantidades de ácidos orgánicos, que sirven para solubilizar y transportar los oligoelementos. Estos materiales deberán ser, seguramente, agentes quelantes, ya que tienen afinidad suficiente para, con los iones metálicos pesados, formar complejos estables solubles en las condiciones de suelo. Estos compuestos son muy probablemente ácidos hidroxílicos, aunque es posible que los aminoácidos, si están presentes, tengan una función similar, ya que ligan también fuertemente ciertos elementos químicos.

Se creía hace algún tiempo que los quelatos distintos de los del hierro no eran eficaces como fuente de oligoelementos para los vegetales. Los quelatos de hierro, son, en realidad, los más estables; pero, sin embargo, en algunos suelos el cinc quelatado es mucho más eficaz para las plantas que en compuestos inorgánicos. Así resulta que las posibilidades de aplicación de los quelatos en nutrición vegetal son

más amplias de lo que se esperaba en un principio. El empleo de agentes quelatadores para aumentar la disponibilidad de elementos químicos esenciales constituye un campo de investigación prometedor.

Si todos los metales estuviesen disueltos, es decir, como quelatos o complejos, se lavarían rápidamente en el subsuelo y se perderían. Una gran proporción de iones metálicos libres se absorben sobre la superficie de los componentes que intercambian cationes en la tierra, como las arcillas y ácidos húmicos y estructuras macromoleculares similares, tanto de naturaleza orgánica como inorgánica. Se unen fácilmente, por lo que con facilidad se separan por medio de los agentes quelantes naturales o artificiales. Sin embargo, recordemos que la mayoría de los metales están en la porción mineral del suero en forma de sales inorgánicas insolubles, tales como aluminatos, carbonatos, silicatos, fosfatos, sulfatos y otras. Lentamente se convierten en formas solubles y, a este respecto es importante el ataque por los agentes quelantes orgánicos, producidos por microorganismos.

Uno de los problemas fundamentales en el uso de los agentes quelantes, como portadores de los iones metálicos en los suelos y soluciones nutritivas es la cuestión de su absorción y de su efecto sobre el metabolismo de las plantas.

La primera cuestión a resolver es si el quelato mismo lo toma directamente la planta o si el elemento químico quelatado se separa por medio de un mecanismo de intercambio en las raíces. En el caso de los quelatos de hierro, los experimentos preliminares con carbono-14 de STEWART y LEONARD sobre agrinos en Florida, y el trabajo adicional de JACOBSON sobre el tomate, el girasol y plantaciones de trigo, en soluciones nutritivas, indican que se absorbe algo del quelato. Esta incorporación de los quelatos metálicos por la planta ha sido confirmada por WALLACE.

La introducción de un agente quelante extraño a la fisiología de la planta presenta implicaciones de largo alcance. Cuando lleva el oligoelemento deficitario al vegetal en estado de quelato al liberarse aquél, el agente quelante puede unirse a otros metales esenciales. Generalmente no se origina daño alguno si el suministro de los elementos químicos que pueden efectuarse es suficientemente amplio para subvenir a las necesidades de la planta. Existe la posibilidad, sin embargo, de crear deficiencias secundarias e incluso de alterar el metabolismo de manera fundamental, tales interferencias pueden ser particularmente graves, ya que vegetales no poseen medios rápidos de eliminación de exceso quelante.

Los quelatos metálicos, cuando se aplican al suelo, parece ser que se absorben por las raíces de las plantas y son trasladados a las hojas, en donde el oligoelemento se hace disponible a los tejidos vegetales. Los procesos fisiológicos que intervienen en la separación del ión metálico del agente quelante no son bien conocidos, pero se presumen diversos mecanismos. Una concentración alta produce una fitotoxicidad.

Aunque todavía falta la ratificación experimental, se ha sugerido un mecanismo para explicar la desaparición aparente del agente quelante. Se sabe que ciertos quelatos férricos son fotosensibles y sus soluciones diluídas, al exponerse a la luz del sol, se convierten en una sal ferrosa al mismo tiempo que se destruye la parte orgánica del quelato por oxidación. Se admite, pues, que probablemente el agente quelante se altera también en la hoja con liberación del oligoelemento en forma conveniente para su participación en el metabolismo normal.

STEWART y LEONARD han verificado una extensa investigación sobre el uso de quelatos en la corrección de las deficiencias de hierro en naranjos, limoneros, etc., y en menor grado, MALCOLM en otras especies vegetales. Existen carencias de este oligoelemento prácticamente en cada Estado de los Estados Unidos. aun cuando el suelo contiene amplias cantidades de este metal, pero que no están en forma disponible.

Los problemas que surgen con la utilización de los quelatos de hierro en diferentes suelos han recalcado la necesidad de un mejor conocimiento de las propiedades químicas de los quelatos y de su interacción con el medio ambiente planta-raíz. Con este propósito se ha investigado la unión del ión férrico con la serie de ácidos poliaminocarboxílicos, tales como ácido etilendiaminotetracético o *edta*; ácido hidroxietilendiaminotriacético o *hedta*, ácido dietilentriaminotetracético, o *etpa*; ácido ciclo-hexan-1,2-trans-diaminotetracético, o *cedta* y un análogo fenólico del edta, el *chel* 138. La capacidad de estos compuestos para proporcionar hierro a las plantas que crecen en terrenos alcalinos se ha relacionado con la estabilidad de sus quelatos.

Se han efectuado ensayos varios en el invernadero, en campo abierto y en el laboratorio, al objeto de determinar algunos de los factores que ejercen influencia sobre la absorción de quelatos de hierro y cinc por las plantas. Dichos estudios se han llevado a cabo por STEWART y LEONARD con quelatos marcados separadamente con hierro-58 y , cinc-65 y carbono -14. Los estudios de absorción del hierro isotópico por las plantas confirman que el metal quelatado es más susceptible de ser absorbido que el inorgánico. En plantas cultivada en distintos terrenos la fijación de cinc del quelato varía considerablemente, comprobándose una relación inversa entre la absorción y la capacidad de intercambio de los suelos.

Se estima que una de las razones de la diferencia en la disponibilidad del cinc inorgánico y del quelatado estriba en la distinta penetración de estos compuestos en el suelo después de su aplicación. La mayor parte del sulfato de cinc se fija en la capa superior del suelo, en tanto que el quelato se distribuye satisfactoriamente por todo el terreno. Las plantas cultivadas en suelos de distintos pH recogen, en medio ácido, mayor cantidad de cinc inorgánico que en medio neutro; sin embargo, cuando este oligoelemento se suministra como quelato, una cantidad mucho más elevada se absorbe de los suelos a un pH de seis o siete que al de cuatro o cinco. Se cree que la posibilidad de absorción del cinc quelatado por los vegetales queda determinada, en gran medida, por la velocidad con que se sustituye por el hierro presente en el suelo.

Diversos compuestos de cinc y mezclas se han comparado como fuentes de este oligoelemento para plantas cultivadas. Los experimentos incluyen sulfatos, quelatos, agentes humectantes y polímeros; con la excepción del acetyl-acetonato, las plantas absorben cantidades de cinc mucho más elevadas de los quelatos que de las otras fuentes ensayadas.

Para el fabricante de abonos el fallo de oligoelementos en las tierras puede ser, y es, motivo de nuevos y más amplios mercados. No obstante, la fabricación de abonos comerciales fortificados con oligoelementos presenta algunos problemas nuevos a la industria en su promoción, producción y aplicación. Muchos centros oficiales de experimentación agrícola de diversos países, y los fabricantes de abonos industriales, estudian los métodos para aliviar las carencias de los cultivos en gran escala. Por ejemplo, en Wisconsin los cultivadores se enfrentan con una

escasez aguda de boro en más de la mitad de las plantaciones de alfalfa. La cuestión principal es la del equipo necesario para incorporar el oligoelemento al abono.

La respuesta a las aplicaciones de uno o más oligoelementos varían según el suelo y las condiciones climáticas de cada temporada, o estación del año. Por este motivo, los preparadores de abonos, en su gran mayoría, efectúan aplicaciones separadas de los elementos. En los sectores del país, donde se viene cultivando el suelo desde hace mucho tiempo, el problema es más pronunciado que en el resto.

El elemento químico que más falta en el sur de los Estados Unidos es el hierro. También hay en esta zona deficiencias de cinc, sobre todo en el área de la Costa del Golfo al este del Mississippi. Muchos suelos de Florida presentan carencias, más o menos agudizadas, de cobre, cinc, hierro y molibdeno. En el Oeste Medio, otros oligoelementos, aparte del boro, son bajos, como el manganeso, hierro y cinc. En el Este se sabe que existen carencias de boro, manganeso, cinc y cobre. Para la nación norteamericana, como un todo, se ha notado una falta general de molibdeno; es un hecho cierto que treinta y cinco zonas separadas de los Estados Unidos sufren la deficiencia de este elemento químico.

Cuando los oligoelementos están ausentes, o no utilizables en los suelos, el uso de un agente quelante artificial está indicado como portador de los mismos. Los reactivos deberán tener una estabilidad suficiente para prevenir la formación de las sales insolubles, pero no ser tan estables que impidan que los elementos químicos esenciales se suelten en la planta. Los ensayos realizados hasta ahora demuestran que, tanto el ácido etilendiaminotetracético, o *cdta*, como el ácido hidroxietilenediaminotriacético, o *hedta*, son portadores satisfactorios para el ión férrico, mientras que solamente el primero se ha empleado con éxito para el cinc, cobalto, cobre y manganeso.

La inestabilidad del quelato *edta-férrico* en soluciones alcalinas lo hace inútil para los suelos calcáreos. El ión vanadilo forma quelatos estables con el citado quelatizante y la investigación de las necesidades de este oligoelemento en el reino vegetal y otros organismos pueden llevarse a cabo satisfactoriamente con dicho complejo.

Se admite hoy día que prácticamente todos los oligoelementos considerados como importantes para las plantas pueden aportarse, en un momento dado, como quelatos, con la excepción probable del molibdeno.

Los resultados de las pruebas prácticas con los quelatos de hierro, a las que antes hemos aludido, han sido en múltiples ocasiones verdaderamente espectaculares. Consecuencia de estos éxitos, en el tratamiento de la clorosis férrica en las arboledas de *citrus* que crecen en suelos ácidos es el empleo masivo de quelatos como abonos adicionales en la Florida central.

El tratamiento eficaz de la predicha clorosis férrica en muchas otras especies, como árboles de sombra, plantas ornamentales, siemprevivas de hojas anchas, plantas subtropicales y legumbres de jardín corrientes, es el resultado de la adición de quelatos. En los suelos alcalinos el hierro no es disponible para las plantas, debido a la insolubilidad extrema del hidróxido férrico y de las diversas sales férricas inorgánicas. Esta condición adversa puede vencerse mediante el uso de los quelatos del *hedta* y del *etpa*.

El grado óptimo de aplicación de quelatos depende del pH, tamaño de la planta, naturaleza del suelo y condiciones climáticas. Los ejemplos referentes al

tratamiento de la clorosis de hierro en plantas distintas de los agrios, se están acumulando rápidamente. Se han logrado mejoramientos rápidos, en mes y medio, de árboles jóvenes de sombra después del uso de quelatos, y lo mismo se señala en el tratamiento de los lirios de Bermuda. Además de todo esto, el abonado a base de quelatos ha resultado útil en la clorosis de aguacates, plátanos, cebada, coles, cerezas, trigo, pepino, hinojo, mostaza, quimbombó, melocotón, cacahuete, pera, patata, espinacas, tomate, y una amplia gama de flores ornamentales.

Con quelatos se tratan eficazmente las deficiencias de cinc en el noroeste del Pacífico. En casos de exceso de arsénico en el suelo –procesos llamados de toxicidad arsenical-, NEWLUM señala que tanto el cinc como el hierro quelatados mejoran las condiciones de crecimiento. En carencias de manganeso en uvas, BEATTIE ha anunciado un aumento en el rendimiento en general, y especialmente del contenido en glucosa, por la aplicación de quelatos.

El uso de los quelatos en el rociado del follaje es a todas luces beneficioso en determinados cultivos. WESTGATE, de la *Florida Agricultural Experimental Station* en Sanford, recomienda su aplicación para las legumbres cloróticas. Las hojas anchas, firmes y gruesas de siemprevivas responden favorablemente a los tratamientos por aspersión con quelatos, mientras que aplicaciones similares son tóxicas para los ornamentales herbáceos con hojas más blandas. El uso de los quelatos en pulverizaciones requiere una consideración previa y cuidadosa de las condiciones ambientales. La “quemadura” del follaje y de la fruta es a menudo el desagradable colofón del exceso de dosis de quelatos.

Estudios expuestos por SHAPIRO sobre las sustancias amarillentas, comúnmente denominadas huminas o taninos del agua, demuestran que estos materiales son ácidos orgánicos alifáticos hidroxidicarboxílicos fluorescentes, de peso molecular aproximado de 450; son probablemente insaturados y no contienen nitrógeno y sí solamente carbono, hidrógeno y oxígeno. Están presentes en los lagos y, aparte de su papel en la coloración del agua y de sus efectos consiguientes sobre la absorción lumínica, son importantes para estimular el crecimiento de ciertas algas. Además son notorios agentes quelantes y de hecho pueden retener el hierro en estado no precipitable durante varias semanas. Parece claro que estos ácidos amarillos están íntimamente asociados con el hierro en los lagos, y con otros oligoelementos como el cobalto, cinc, cobre y manganeso.

## QUELACIÓN, OLIGOELEMENTOS Y MICROORGANISMOS

Los agentes quelantes se presentan en sistemas biológicos naturales y, como hemos referido, tienen funciones que son vitales para el organismo: catálisis de las reacciones de óxido-reducción, transporte oxígeno y anhídrido carbónico, hidrólisis, síntesis de proteidos y otras semejantes. Por tanto, no sorprende que la adición de los agentes quelantes artificiales tenga un profundo efecto sobre dichos sistemas. Pueden inhibir, parcial o completamente, la acción metal-enzima si son suficientemente poderosos para competir con el enzima en relación con el oligoelemento. Si la función es esencial se produce la muerte del organismo de otra manera, éste, por lo menos, se debilita con la inhibición del fermento.

En general, los usos de los agentes quelantes no-naturales en los sistemas biológicos se pueden clasificar de tres maneras:

- a) Destrucción del organismo por quelación de sus metales esenciales, esto es, acción bactericida y fungicida.

- b) Inhibición de ciertos oligoelementos y enzimas metálicos, con objeto de estudiar sus funciones en medios biológicos.
- c) Separación de elementos químicos no deseables o tóxicos para los organismos vivos.

La acción antibacteriana de ciertos compuestos, tales como la 8-hidroxi-quinolina, tetraciclinas, isoniazida, etc., se atribuye, al menos en parte, a su capacidad para quelatizar oligoelementos que influyan en sistemas enzimáticos y particularmente en aquellos en los que participan metalflavoproteidos.

En vista de las numerosas teorías que se han emitido respecto al mecanismo de la acción antibacteriana de los agentes quelantes, BECKETT, VAHORA y ROBINSON han realizado experimentos en *Staph. aureus*, examinando la interacción de soluciones con oxina, hierro o con ambos. Encuentran que el hierro mediatiza la incorporación de la oxina por el microorganismo.

Las oxinas derivadas de la 8-hidroxi-quinolina hacen mucho que se sabe actúan como bactericidas y fungicidas. ZENTMYER sugiere que la acción fungicida de la oxina es debida a la inactivación de los iones metálicos esenciales y demuestra que esta actividad se podía invertir por la adición de cinc, posiblemente por formación de un oxinato de este metal. ALBERT y sus colaboradores han investigado la acción bacteriostática de la I-hidroxiacridina, de la oxina y sus derivados y de muchos otros agentes quelantes.

Existe una correlación digna de hacerse notar entre las propiedades de quelación y las antibacterianas. Por ejemplo, de las monohidroxi-quinolinas, la oxina fue, con exclusividad, la que presentó actividad y también la única capaz de formar quelatos metálicos. Se ha encontrado que la sustitución por grupos inertes, es decir, que posiblemente no atañen a la quelación, en algunos casos lo hacen adversamente para la eficacia y en otros no producen efecto. De este modo, las actividades de la 2-metil-oxina y de la I-hidroxiacridina están grandemente reducidas comparadas con la oxina, mientras que la sustitución en las posiciones que están separadas de los grupos donadores (5-metiloxina, 5, 6-benzoxina y 6-hidroxi-m-fenantrolina) producen el mismo orden de actividad que la oxina misma. Este comportamiento es comprensible actualmente, puesto que sabemos que las sustituciones en la oxina, como en los dos compuestos menos activos anteriormente mencionados, inhiben la quelación con ciertos oligoelementos *in Vitro*.

ALBERT y sus colaboradores han señalado también diferencias en la sensibilidad a la oxina para las bacterias gram-positivas y gram-negativas; el crecimiento de los tipos gram-positivos se evita con concentraciones mucho más bajas de oxina. El trabajo preliminar sobre la inversión de la bacteriostasis añadiendo metales, muestra que el efecto de la oxina sobre las bacterias gram-positivas se invierte por el cobalto pero no por los otros oligoelementos empleados y que las bacterias gram-negativas menos sensibles presentan una inversión con el cinc y el hierro.

Debido a la actividad específica de la oxina y sustancias similares y a la falta de efecto de muchos agentes quelantes, que son tan poderosos como la oxina en desactivar los elementos vestigiales en solución, ALBERT y sus colaboradores admiten que el lugar de la interacción es en una superficie, tal como la unión de ión metálico con un enzima, más que una combinación con oligoelementos libres en el medio.

Se está en los comienzos de la investigación con sistemas biológicos que emplean concentraciones, subóptimas de oligoelementos como medio de, saber de la función



de éstos *in vivo*. No obstante, se puede llegar a ello reduciendo la concentración de los metales por combinación con un agente quelante.

WARING y WERKMAN han empleado un medio bacteriológico sintético, saturado con oxina y extraído con cloroformo al objeto de separar todos los oligoelementos que forman oxinatos por adición de indicios de cinc, cobre y manganeso se logra un cultivo con todos los requisitos, excepto el hierro. De la misma manera, PIPER ha preparado un medio deficiente en cobre mediante extracción ditizona-cloroformo para estudios del crecimiento. También la tiourea y la salicilaloxima se han empleado para disminuir, por quelación, la concentración de los indicios de cobre disponible para el alga microscópica *dorella* y un cierto número de oxidasas.

Se cree que la propiedad fungicida de las oxinas es debida fundamentalmente a la quelación del cinc, oligoelemento esencial. Igualmente, hay una correlación grande entre la quelación y la acción bactericida, aunque no siempre. Muchos quelatadores fuertes inhiben el crecimiento del colibacilo, el estafilococo, el estreptococo y el *proteus* y unos pocos afectan al piociánico. Aunque la penicilina forma sales insolubles, esta propiedad no ha sido bien explorada a pesar de que muchas bacterias dependen de los metales indiciarios u oligoelementos.

Muchos quelatadores son fungicidas, antisépticos o bactericidas. Según MARTELL y CALVIN, de los diecinueve agentes quelantes orgánicos corrientes, de uno o más metales de transición, trece impiden el desarrollo del *B. subtilis*, y siete el del colibacilo. La 8-hidroxiquinolina es eficaz contra el *Clostridium welchii* y la mayoría de ellas inhiben el *Streptococcus hemolyticus*, *Staphylococcus aureus* y el *Scherichia coli*, y en menor grado al *Proteus* y al *Pseudomonas aeruginosa*. Parece que se fijan el cinc y el manganeso, pero pueden estar implicados también el hierro y el cobalto: el cobre no, pues sus reactivos en general son inertes. Por tanto, es perfectamente posible que la acción bactericida de muchos antisépticos y antibióticos, dependa íntimamente, de la fijación o quelación de un metal.

De los estudios cuantitativos en seis especies de bacterias, y en particular con *Staphylococcus aureus*, se puede afirmar rotundamente que la actividad antimicrobiana de las oxinas están en relación directa con su poder quelante. Las estructuras, que forman complejos hidrofílicos, probablemente incapaces de penetrar en la célula como el análogo de ácido 5-sulfónico, son inactivas como antibacterianas, aunque *in Vitro* la quelación sea vigorosa.

La 8-dihidroxiquinolina forma precipitados con varios metales pesados y en condiciones fisiológicas de temperatura y pH, de los siete hidroxil-isómeros posibles sólo ella forma quelatos. No es tóxica para las bacterias, pero se vuelve tal cuando hay vestigios de hierro, porque el agente bactericida es el quelato oxina-hierro.

Los quelatadores pueden inhibir al *Lactobacillus acidophilus* por secuestro del manganeso indispensable para su reproducción. Es probable que la acción esté más bien relacionada con una mejor aproximación de las sales de hierro solubles a las superficies absorbentes, aunque no se excluye el transporte efectivo del quelato.

Para estabilizar los medios de cultivo en microbiología y mantener constante la concentración de un determinado oligoelemento, puede añadirse a la solución un agente quelatador específico que actúe como auténtico amortiguador. En este sentido puede inhibirse el desarrollo de ciertas bacterias y hongos, favoreciéndose, en cambio, el crecimiento de otros.

METZLER, IKAWA y SNELL han propuesto un mecanismo general para las reacciones catalizadas por el piridoxal en las que hay una necesidad de un ión metálico multivalente. La recemasa de la alanina, las decarboxilasas, las transaminasas, las dehidrasas y las desulfhidrasas representan tipos de sistemas enzimáticos en los que actúa como cofactor el piridoxalfosfato. Cada uno de ellos ha sido reproducido en sistemas modelo no enzimáticos consistentes en una solución acuosa de los sustratos apropiados, piridoxal y oligoelementos como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Al}^{3+}$ . Del estudio de estos sistemas, METZLER, DAVIS LONGENECKER y SNELL sugieren que las bases de SCHIFF, derivadas de aminoácidos y piridoxal, se estabilizan por quelatación. Las subsiguientes reacciones intramoleculares como expulsión de  $\text{H}^+$ ,  $\text{CO}_2$ , o  $\text{SH}^-$ , acopladas a un transporte de electrones producen quelatos que se hidrolizan espontáneamente en los productos de reacción esperados. Así el oligoelemento parece preformar la función catalítica del proteido específico en la reacción enzimática; el grupo fosfato del piridoxal fosforilado se piensa está implicado en la unión de la base de SCHIFF con el proteido del enzima. GUIRARD Y SNELL encuentran que la histidin-decarboxilasa del *lactobacillus* 30 necesita para su actividad fosfato de piridoxal e iones  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Al}^{3+}$ , siendo relativamente ineficaces o inhibidores otros cationes. A este respecto, EGGLESTON ha demostrado que muchas descarboxilasas bacterianas de monopeptidos se activan por oligoelementos bivalentes.

Refiere VEIXBERG que los cambios de la actividad antimicrobiana de un producto durante su transformación en quelato depende del tipo del mismo y se estudian actualmente cuatro posibles papeles de quelación: a) La actividad antimicrobiana desaparece cuando el producto es neutralizado por ciertos cationes (tetraciclinas); b) El catión puede ser precisamente el oligoelemento que el producto quita a la célula (isoniazida, tetraciclinas), y de ahí que su adición al medio suprime la acción antimicrobiana del producto; c) La presencia de un catión metálico puede proteger a la célula microbiana de la acción tóxica del producto si este último actúa sobre ella formando quelato (8-hidroxiquinolona, tetraciclinas e isoniazida), y d) La fijación del compuesto a la célula microbiana se suprime por un agente metálico de ligazón y se refuerza por cationes metálicos (penicilinas), o al contrario (estreptomocinas, polimixinas).

Se ha comprobado que, generalmente, los iones  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  influyen en la actividad de los productos ante los microbios gram-positivos, mientras que los de  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  inhiben su actividad ante los gram-negativos. Los iones  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$  afectan más especialmente a las sustancias antituberculosas.

Cuando se emplean radioisótopos en estudios sobre cultivos de microorganismos en crecimiento, es esencial que se conserven homogéneamente distribuidos. El uso del plutonio como emisor de radiaciones alfa en los cultivos se complica por su tendencia a ser absorbido o tomado por las células; los agentes quelantes disminuyen la deposición y promueven su eliminación. Se ha planteado la cuestión de si los agentes quelantes son también eficaces para disminuir o evitar la ingestión de plutonio en las células en crecimiento y permiten su uso como fuente de radiación alfa en los cultivos de los microorganismos. Al parecer, las investigaciones de BAIR y HUNGATE aclaran que los quelatadores amplifican la sensibilidad a la radiación probablemente por un cambio general en el equilibrio electrolítico de la célula más que por una deficiencia específica del calcio, ya que la

adición de este elemento químico a alguno de los cultivos no altera el efecto del agente quelante.

## QUELACIÓN, OLIGOELEMENTOS Y TERAPÉUTICA

Desde el punto de vista farmacológico, la quelación representa, por una parte, la solución de problemas médicos prácticos, como el tratamiento de envenenamientos, y, en otro sentido, aclara puntos relacionados con el mecanismo de acción de numerosos medicamentos.

Las aplicaciones de la quelación en farmacología son tantas y, tan sugestivas que, como indica PUIGDOLLERS ciertos autores algo optimistas han llegado a considerarla, con hipertrofia de sus posibilidades, como la terapéutica del futuro. No obstante, no hay duda que constituye un método de actualidad (FERRANET Y CLAVEL).

Los metales que entran en los agentes quelantes artificiales para originar quelatos no deben ser cualesquiera, ya que podrían ser sustituidos por elementos químicos de la sangre. Se puede evitar este riesgo administrando el quelato apropiado y, sin embargo, conviene que éste sea menos estable que el que se debe formar con el metal peligroso; es decir, es necesario que el elemento químico en cuestión tenga una constante de quelación o complejidad más elevada. La elección del quelatador se debe inspirar, pues, en sus afinidades particulares y en otros factores, tales como toxicidad, solubilidad, tamaño de las micelas de su solución coloidal, etc.

Por otra parte, se ha intentado que actúen los agentes quelantes que podríamos calificar de fisiológicos, que así se han ensayado las inyecciones de ácido fluoracético, que inhibe la transformación del ácido cítrico en ácido cisaconítico en los ciclos glucolíticos que se producen en el interior de las células, concretamente en las mitocondrias; de este modo los niveles hísticos de dicho ácido tricarbóxico se elevan notablemente y permiten su quelatización con metales tóxicos.

Desde el punto de vista terapéutico, hay que insistir sobre la conveniente inocuidad del agente quelante y su posibilidad de repercusión sobre la calcemia, cuya caída lleva consigo crisis tetánicas, con la huída renal del calcio. Esto explica la conveniencia de un quelato cálcico que conserve su poder de captación hacia los iones tóxicos y que respete la calcemia. Por el contrario, el desplazamiento del calcio por otros iones puede determinar su liberación masiva susceptible de provocar choques, evitables por administración del medicamento en inyección intravenosa lenta.

La posibilidad para ciertas sustancias orgánicas, agentes quelatadores, de combinarse con iones positivos bi o trivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ), formando derivados estables, y desprovistos de toxicidad, ha llevado a los terapeutas a utilizados con objeto de eliminar del organismo iones metálicos cuya naturaleza o la sobrecarga, según CAVIER y SAVEL puede ser nociva.

La inclusión de los agentes quelantes en el arsenal terapéutico de los procesos tóxicos con metales ha conseguido francos éxitos, tanto en las formas agudas como en las subagudas, crónicas e incluso subclínicas. Tras su administración en la intoxicación saturnina desaparecen los dolores viscerales y neuríticos, se funde el ribete de BURTON; cede y deja de observarse el punteado basófilo de los hematíes junto a otras anomalías hemáticas, aumenta la plumburia y disminuye la eliminación de coproporfirinas. También han sido estudiados por varios autores en

las hemocromatosis secundarias, con excelentes resultados. En las formas idiopáticas no se han obtenido curaciones tan brillantes.

COTTER ha tratado, satisfactoriamente, casos de envenenamiento con cadmio mediante los agentes quelantes. La administración se efectúa por vía oral y el mecanismo del proceso consiste en reemplazar un ión cálcico en el agente quelante por el ión cadmio. No hay secuelas y la excreción del quelato se realiza, sin irritación alguna, a través de los riñones. Los síntomas de intoxicación cádmica, con sus disturbios hepáticos, renales y de la función de la médula ósea, así como los clásicos síntomas pulmonares y mentales con marcada irritabilidad, desaparecen rápidamente.

La principal dificultad en el tratamiento de estas intoxicaciones agudas y crónicas reside en establecer el contacto entre el agente quelante y el metal depositado en los tejidos. Los quelantes son armas que se deben emplear en seguida, mientras que el metal tóxico se encuentra todavía en la sangre; son además de doble filo, ya que pueden transportar el elemento perturbador a lugares que no hubiera podido llegar normalmente. No es extraño, pues, que se hayan citado casos de neuritis sobrevenidos después del tratamiento de intoxicaciones, poco marcadas, con agentes quelantes.

Antiguas observaciones clínicas, como el eczema de níquel, que se produce con una dieta rica en fruta fresca con ácido cítrico, se explican hoy por formación de quelatos eliminables.

Las intoxicaciones por meta-les radiactivos en las industrias atómicas, aparte de las posibles agresiones de carácter bélico, motivan suficientemente el interés que suscita toda posibilidad de tratamiento. Con los agentes quelatadores, administrados precozmente, se ha logrado fijar los isótopos radioactivos tóxicos, formando quelatos coloidales hidrosolubles, rápidamente eliminables por los emunctorios naturales. Se han empleado como profilácticos jabones detergentes a base de agentes quelatantes que secuestrarían los metales adheridos a los tejidos.

En otro aspecto, los agentes quelatadores pueden servir para regular y dirigir el uso de los isótopos como medicamentos anticancerosos. En efecto, el itrio-90, muy útil en la carcinomatosis por sus emisiones beta, combinado con el *edta* se deposita en el hueso y, por el contrario, quelatizado con una mínima cantidad de *edol* se concentra en la pared del estómago. FOREMAN también ha indicado el empleo de agentes quelantes en la eliminación del itrio radioactiva. Cuando este elemento químico se inyecta en forma no compleja, se elimina menos en el mismo lapso de tiempo que cuando se administra como quelato. Estas investigaciones demuestran que los agentes quelantes son útiles para aumentar la expulsión del itrio que ha sido ya depositado en el cuerpo.

WILL y VILTER encuentran una diferencia insignificante entre los quelatos de hierro y las sales del mismo metal radioactivo al medir su absorción en sujetos normales y patológicos. Un quelato de cobre radioactivo -la sal sódica del ácido tioureabenzoilalilo- es menos tóxico al ser inyectado intravenosamente y cede más cobre al hígado, y menos a otros órganos, que el acetato o el glicocolato de este oligoelemento.

La litiasis es una enfermedad metabólica. No conocemos verdaderamente el mecanismo íntimo y exacto de la litogénesis, pero la disolución de cálculos puede representar un gran avance. Mediante el empleo de agentes quelatadores ha sido

posible disolver concreciones de fosfatos, oxalatos y carbonatos, en un medio casi neutro, como si fuesen atacados por un auténtico agente ácido. Los resultados experimentales de CARRON, y los clínicos obtenidos por GEHRES y ABESHOUSE y AUVERT, han sido satisfactorios a este respecto.

KOJAHN y LUCAS han señalado una estrecha correlación entre la tendencia hacia la formación de complejos de plata de compuestos aromáticos policíclicos y su carcinogenicidad.

Las propiedades quelantes de numerosos medicamentos antituberculosos se han puesto en evidencia desde hace tiempo. Así, la isoniazida es capaz de formar un quelato con el cobre, y su actividad aumenta bastantes veces más si se administra a la vez con él. En cambio, la isonicotini1-I-metil-hidrazida es inactiva e incapaz de dar un anillo quelatado, a pesar de no diferir de la isoniazida más que en un grupo metilo. Sin embargo, la actividad tuberculostática no está unida, claro está, a este solo factor; otras sustancias, próximas a la isoniazida y quelantes, no poseen efecto alguno antifímico. FOYE y DUVALL han aislado y caracterizado los quelatos cúprico y ferroso del ácido paraminosalicílico. Las propiedades antituberculosas del quelato de cobre son superiores a las del ferroso, que apenas poseen acción. Los mismos autores han estudiado los quelatos de cobre, cobalto, hierro y cinc de la hidracida del ácido isonicotínico. Las proporciones de isoniazida metal son de 1: 1 y 2:1. El efecto sobre la tuberculosis experimental de estos quelatos es comparable al de la isoniazida y se admite la posibilidad de que ésta ejerza su acción tuberculostática como quelato 1 : 1. La isoniazida: puede inhibir la destrucción de la histamina con un enzima catalizado con cobre.

Los depresores vasculares que no actúan sobre el sistema nervioso vegetativo son todos quelatizadores: tiocianatos, mercaptanos, tiohidrazinas, etcétera. La acción vascular de ciertos quelatos ha sido estudiada por VARELA, SANZ y CASTELLÁ.

Los laxantes llamados irritantes, del tipo de la fenolftaleína y de las hidroxiantraquinonas, tienen propiedades que dependen de la formación de uniones quelatadas por sus grupos oxhidrilos. La actividad laxante disminuye o desaparece si los hidroxilos cambian de posición o sufren sustituciones. Por tanto, se supone que el quelante permite un contacto íntimo entre un elemento químico biogénico y las partes reaccionales de la pared del intestino o vascular; tanto más cuanto que ciertos oligoelementos tienen ya actividad por sí mismos, la vasodilatadora del cobalto o la vasoconstrictora del vanadio. El problema no está totalmente resuelto, ya que ciertas modificaciones de la molécula de los laxantes, que aumentan la facultad de formar quelatos. disminuyen, por el contrario, sus propiedades farmacológicas.

La anemia benigna producida por la terapia de la hipertensión con hidrazinofalazina se ha achacado a su afinidad quelante por el hierro.

Se sabe, desde hace mucho tiempo, que los *isómeros meta* y *para* del ácido hidroxibenzoico no tienen ninguna acción antipirética, mientras que el isómero *orto* o ácido salicílico es activo; las dos primeras no son agentes quelantes y la tercera si, lo que permite se combine con un oligoelemento de los llamados de transición, tales como el cobalto, cobre, hierro. manganeso, cinc, etc. La aminopirina., otro antitérmico, reúne las mismas condiciones. En las enfermedades infecciosas febriles existe una elevación de la cupremia; se sugiere que la infección produce un daño biológico en la célula, con raso del cobre intracelular al plasma y los antipiréticos le reintegrarían a aquélla en forma de quelato. El ácido gamma-resorcílico ha sido investigado también porque quelatiza en

mayor grado y al parecer posee una eficacia diez veces mayor que el ácido salicílico. BERGEL, en una interesante discusión sobre la acción antirreumática, achaca toda su acción beneficiosa a una reducción de iones libres de metal pesado.

Numerosos medicamentos antitumorales poseen la facultad de entrar en combinaciones quilatadas como tales, o después de sufrir modificaciones metabólicas. De este modo, la 6-mercaptapurina entra en los quelatos por su grupo sulfhidrílico y se inactiva si éste bloquea con un grupo metilo. Por otra parte, la betanaftilamina carece de acción, pero si se le añade un oxidrilo en posición gamma, puede formar uniones quilatadas y convertirse en un agente carcinógeno.

Se han efectuado numerosos estudios *in Vitro* de los antibióticos en relación con quelatos y oligoelementos. Las conclusiones a que se ha llegado han sido a veces muy dispares. De ordinario el cloranfenicol no se afecta por las variaciones de iones metálicos. Aunque la aureomicina y terramicina formen quelatos, su inactivación específica, por ejemplo con manganeso, hace difícil la interpretación de tales experimentos. Las posibilidades de otros antibióticos en relación con la quelación, tales como cido aspergílico, polimixinas, estreptomicinas, albomicina, etc., requiere un examen cuidadoso antes de emitir hipótesis que de otro modo podrían resultar aventuradas. Es posible que los hígados grasos producidos por la aureomicina se deban a su capacidad quelatizadora. TEILLON y VELU han comprobado que las tetraciclinas quelatan el magnesio y el hierro con pérdida de actividad antibiótica.

LIEBERMANN ha comunicado que en los tiouracilos hay conexión entre su capacidad quelatizante y su actividad antitiroidea y sugiere una formulación para el quelato, que parece insostenible por razones estéricas. Es probable que estas sustancias formen enlaces corrientes muy firmes, que no son de quelación, con metales, como los forman otras muchas sustancias con grupos tiólicos. Se han comunicado otras varias conexiones interesantes entre los metales y el comportamiento del tiroides; recordemos a este respecto la reacción bien conocida entre la tiurea y el cobre.

La reducción de los niveles de oligoelementos en tejidos se realiza por sustancias antitiroideas y por glucósidos cardíacos. La administración del  $\alpha_1.\alpha'$ -dipiridilo, quelante ávido del hierro, causa la excreción de ácido homogentísico en los cobayos -alcaptonuria- cuando se administra la tirosina en exceso. *In Vitro*, los tejidos de estos animales demuestran una actividad disminuida de la homogentisinasa que aumenta por adición de iones ferrosos. Un complejo quilatado de sulfato ferroso y el ácido  $\alpha$ -aminoacético desecado, se ha empleado como agente terapéutico para reemplazar al hierro en la anemia hipocrómica. CLANCY, FELDMAN, ALDRICH y CANDON opinan que el nuevo preparado hematínico se tolera bien y da excelentes respuestas entre los "reactores" al hierro previamente conocidos. La administración de dosis eficaces de hierro en el tratamiento de las anemias ferropénicas se complica porque sus compuestos no son inocuos. El hierro en forma de sulfato o gluconato ferroso aumenta el nivel en el suero sanguíneo y ocasiona síntomas más intensos de intoxicación que las dosis equivalentes de su derivado quelatado con citrato de colina o con aminoácidos. Los trabajos de FRANKLIN, ROHSE, HUERGA y KEM aclaran que la administración de comprimidos a pacientes durante unos diez años en forma de quelato solamente produce síntomas gastrointestinales en un bajísimo tanto por ciento de enfermos y, en éstos, es posible continuar la medicación, ya que todos los síntomas desaparecen rapidísimamente. HERRIDGE ha efectuado un estudio comparativo entre diversos preparados de

hierro y quelatos de este metal en la anemia hipocrómica y obtiene con estos últimos los mejores resultados.

La quelatación del hierro reduce su toxicidad y origina un alto factor de seguridad frente a las intoxicaciones fatales, con buenas respuestas hematopoyéticas y clínicas.

Las bases de utilización del ácido etilendiaminotetracético o *edta*, como medicamento, están en su poder de captación, que aumenta con el pH, por lo menos, en una cierta zona: varía en razón inversa de la temperatura y depende de la valencia del elemento químico. Es este último el factor más importante, ya que determina la posibilidad de desplazamiento de un ión por otro; es así que en orden de afinidad decreciente se encuentran:  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Li}^{+}$  y  $\text{Na}^{+}$ . TORRES ha revisado ampliamente el estado de la terapéutica con este compuesto.

La secuestración y transporte de una gama amplia de oligoelementos puede conseguirse *in vivo* con el *edta* cálcico. El ejemplo más notable es el plomo; gran número de casos de intoxicación saturnina crónica y aguda en el hombre, animales domésticos y animales de laboratorio se tratan así eficazmente (DANTÍN). Sin embargo, KEHOE advierte que el uso del *edto* para la profilaxis de la intoxicación saturnina no debe sustituir los métodos de la higiene industrial, que se han consolidado con el tiempo. Las mejores indicaciones se refieren al tratamiento de la intoxicación saturnina; en ella el plomo es rápidamente eliminado por la orina y los síntomas se atenúan desde las primeras horas del tratamiento. Durante la terapia por envenenamiento con plomo se observa una diuresis paralela con la excreción de cinc, que se sugiere proviene de la anhidrasa carbónica renal.

También para el tratamiento de las intoxicaciones por otros metales pesados como el hierro -en las hemocromatosis y en la diabetes bronceada-, el cromo, el manganeso, el cadmio, el cinc y el cobre. LANGERON, PAGET, CROCCEL y RONTIER han tratado casos de hemocromatosis, en diferentes estadios de la enfermedad, con el calcitetracemato disódico. Encuentran que la administración precoz de este tratamiento quelatizante previene notablemente la thesaurismosis visceral y favorece la eliminación del hierro; aunque la medicación se prolongue años no se observan accidentes. Los primeros tratamientos de intoxicaciones mercuriales no han dado resultados concluyentes. En el tratamiento de sobrecargas cálcicas (esclerodermias, concreciones calcáreas, litiasis renales) se administra el *edta* por perfusión lenta.

RUBIN y sus colaboradores han conseguido resultados bastante sorprendentes en la separación del níquel de los seres humanos. Inyectan varias veces las dosis tóxicas del níquel, pero en forma de complejo del *edta*; no aparecen entonces efectos dañinos y la mayor parte del metal se expulsa en unas horas como quelato por la orina. CSAPO y AXDRASSY han tratado satisfactoriamente con *edta* un caso de intoxicación por ingestión de acetato de uranilo.

Conocida es la acción anticianuro del cobalto y también su toxicidad en forma de sales inorgánicas. De ahí que PAULET haya estudiado, con buenos resultados, el empleo de quelatos, como el de *edta*, a base de cobalto por su acción antidota en el curso de las intoxicaciones cianhídricas.

En relación con la radiactividad, no cabe duda de que la radiación puede soltar los iones metálicos de combinaciones inocuas para que ejerzan su acción tóxica. BACO

y HERVE han hallado que el *edta*, y varios agentes quelantes más son efectivos contra la intoxicación radioactiva, por ejemplo, con radioitrio; sin embargo, SPENCER y sus colaboradores afirman que impide la excreción urinaria del radioestroncio.

Se utiliza también el *edta* en el tratamiento de las hipercolesterolemias y de la arterioesclerosis. Se intenta así bloquear los oligoelementos necesarios para los procesos enzimáticos que aseguran la síntesis del colesterol.

El *edta* resulta útil como anticoagulante *in Vitro*, pero no parece que ejerza efecto alguno sobre los mecanismos de coagulación *in vivo* en dosis razonables, aunque POPOVICI y sus colaboradores señalen una disminución de plaquetas al infundirle para controlar los estados de hipertensivos en el hombre.

Otro uso evidente de *edta* sódico es para la disolución de los cálculos de las vías urinarias. Una idea similar sugirió su feliz uso en las opacidades córneas calcificadas.

La posibilidad de secuestrar vestigios de metales pesados, que disminuyen la estabilidad de las soluciones de drogas, ha conducido al uso del *edta* en soluciones con adrenalina, penicilina, etc.

Los quelatos del *edta* con el plomo pueden servir como contrastes radiológicos y por vía oral para radioscopia del aparato digestivo; presenta ventajas sobre la papilla de bario, ya que se absorben con mayor dificultad por el tracto gastrointestinal. En inyección endovenosa, para urografías, arteriografías, esplenoportografías, etc., resultan menos irritantes que los derivados yodados.

No es, en cambio, el *edta* un agente conveniente para el control de la hipercalcemia y, al parecer, encierra algunos riesgos. Se ha comunicado que su complejo cálcico es una fuente - de este elemento alcalinotérreo. pero no ha sido confirmado. Las calcificaciones heterotópicas -del tipo del síndrome de THIBIERGE-WEISENBACH - han sido tratadas con *edta* con resultados algo dispares. Probablemente sería muy interesante estudiar su efecto en osteoesclerosis en la que, sin duda, existe un aumento del depósito calcio óseo.

La sal disódica del *edta* sirve para el tratamiento de las corrosiones producidas con cal, y diferentes procesos de calcificación. Las acciones secundarias consisten, sobre todo, en trastornos renales. En tecnología se eliminan con el etilendiaminotetracetato elementos químicos que, como afirma WENDT, producen modificaciones indeseables en medicamentos, alimentos, etc.

Se ha investigado poco la influencia del *edta* sobre las acciones de otras drogas. Al parecer, sinergiza con los barbitúricos y, en forma de ácido, en los gatos hiperdigitalizados normaliza sus irregularidades cardíacas.

Se ha demostrado que el *edta* de calcio, marcado con carbono catorce, se oxida en muy pequeña proporción en ratas y se expulsa intacto, después de una hora aproximadamente. Como la mayoría de los ácidos polibásicos, no penetra en los eritrocitos. En el ser humano se comporta de manera similar con la característica de que la penetración en el líquido cerebrospinal es lenta, se absorbe poco en el intestino y en absoluto por la piel.



Se ha visto que el *edta* se elimina de manera práctica y cuantitativa por la orina como un quelato, generalmente de calcio, y que no se metaboliza en el cuerpo, por tanto, sería un reactivo ideal para estudiar el efecto del desplazamiento de ciertos oligoelementos de los animales y plantas. Los trabajos de RUBIN y sus colaboradores muestran una recuperación de los niveles de calcio en el suero sanguíneo a partir de las reservas cálcicas en el cuerpo, según citan MARTELL Y CALVIN. Si se administra o absorbe lentamente, y durante un tiempo limitado, este agente quelante no es tóxico. FORDIAN ha estudiado el efecto desde el nacimiento, de la administración lenta del *edta* a ratas en una dieta libre de calcio. Los animales control presentan tres veces el crecimiento de los que se administra el agente quelante: aparentemente, además, tiene lugar en el nacimiento el agotamiento del calcio y de otros metales presentes. RUBIN por otra parte, ha hallado que el *edta* no tiene efecto sobre los animales con una dieta que contiene cantidades normales de calcio; la eliminación de éste, aparentemente elevada, se equilibra por una absorción aumentada. Otra pieza importante del trabajo es el descubrimiento llevado a cabo por FOREMAN y HUFF de que la inyección intraperitoneal de agentes quelantes aumenta la cantidad de hierro excretado. Esto merece señalarse, puesto que, como afirman MARTELL Y CALVIN, el hierro no es nunca normalmente eliminado del cuerpo en cantidades apreciables.

PETERS, STOKER y THOMSON observaron que la acción excitante del gas de guerra lewisita, sobre los tejidos cutáneos y mucosas, estaba relacionada con la inactividad que determinaba sobre el sistema enzimático de los piruvatos, y muy especialmente con su capacidad para apropiarse de los grupos sulfhidrilos existentes en las células epiteliales. Los estudios de estos autores llevaron al descubrimiento del 2-3-dimercaptopropanol o *bal*, al que ya hemos aludido anteriormente, que constituye un importante agente quelatador. Una serie de investigadores enfocaron su atención hacia la teoría -para la cual había ya evidencia considerable- de que la toxicidad del arsénico trivalente es, en gran parte, debida a sus uniones con los grupos tiólicos esenciales de enzimas. Este concepto sigue en pie por la significativa observación de que los ditioles, como el *bal* no sólo previenen la inhibición de los sistemas enzimáticos por los arsenicales, sino que los reactivan.

La inhibición de enzimas producida por la lewisita y el arsénico pueden prevenirse por el *bal* u otros ditioles análogos, y además estas inhibiciones pueden ser revertidas. Tripanosomas o espermatozoos sometidos a la acción de concentraciones letales de arsénico y observados microscópicamente se ve que pierden toda su motilidad y presentan cambios degenerativos. Si se adiciona entonces un ditiol del tipo del *bal* recuperan su motilidad y su apariencia

citológicamente normal por la formación consiguiente de quelatos.

Como ya tuvimos ocasión de recoger hace años, en un trabajo con ALONSO SAMANIEGO, el *bal* ejerce un efecto inhibitorio en la glucólisis del cerebro, posiblemente por quelación de oligoelementos que toman parte en los procesos enzimáticos que les concierne. También destruye la actividad fisiológica de la insulina, posiblemente debido a la reducción de los grupos disulfuro de su molécula. Estas reacciones del *bal* pueden ser las responsables de la toxicidad de este compuesto cuando se inyecta en grandes cantidades. Experimentos realizados con la succinoxidasa, que contiene grupos tiólicos, han demostrado que metales, tales como plomo, antimonio, vanadio, bismuto, cadmio y cinc producen inhibición completa y que la enzima se reactiva por la adición de ciertos derivados del *bal*. Induce además este agente quelante efectos antihistamínicos.

EAGLE, MAGNESON y FLEISCHMAN entre otros, han publicado interesantes trabajos sobre los usos clínicos del *bal* relativos al tratamiento del envenenamiento arsenical; excreción del arsénico en sujetos normales después de exposición a vapores arsenicales; administración percutánea y parenteral; inyección intramuscular, etc. Según LONGCOPE y LEUTSCHER, MCCA.NCE y WIDDOWSON y MC DONALD, el *bal* es también útil para eliminar el mercurio, el cinc y el cobre, respectivamente; remueve más plomo que el *edta*, pero su complejo es soluble y tóxico. También provoca una buena eliminación la beta-mercaptoetilamina.

Recientemente, ROUHER ha dado cuenta de que el *bal* en solución oleosa y en inyección es eficaz en oftalmología, en afecciones tales como: quemaduras de la córnea, chalcosis, siderosis oculares; incluso cita curaciones de neuritis ópticas saturninas.

Actualmente se efectúan numerosos ensayos con colorantes que forman lacas insolubles con los metales tóxicos. Se trata del principio bien conocido de la aplicación de un mordiente y permite fijar el metal peligroso en los tejidos en combinaciones inertes, inofensivas. En estos casos, como con los quelantes que forman combinaciones solubles, la constante de unión del colorante con el metal tiene que ser mayor que la de éste con los enzimas hísticos que bloquea. En este sentido ha resultado muy fructífero también el ácido aurintricarboxílico o *ata* que protege al ratón frente al berilio, inhibidor de la fosfatasa alcalina.

Como señala SEVEN, los agentes quelatizadores están usándose cada vez con mayor frecuencia en medicina clínica. Poco se ha publicado sobre la toxicidad de estos agentes. El Consejo sobre drogas de la *American Medical Association* ha recomendado una dosis, por vía intravenosa, de etilendiamino-tetracetato-disódico de calcio, hasta de cinco miligramos; administrado durante un período de casi una semana a pacientes de peso medio, para el tratamiento de la intoxicación por plomo. Se han registrado algunos casos en los que los agentes quelatizantes fueron tóxicos y peligrosos: a unos se les administró *edta* disódico como tratamiento de la hipercalcemia, Y a otros el *edta* disódico del calcio para combatir la

contaminación por plutonio. Se ha estudiado también la eficacia del agente quelatador, hidroxietileno-diamino-triacetato-N -disódico o *edta* en el tratamiento de las enfermedades por retención de metales pesados, empleando la vía intravenosa. con frecuencia. durante un largo tiempo y con intervalos de veinticuatro horas. La dosis inocua máxima parece ser de tres gramos, en un período de un día, y otras cantidades mayores producen, a veces, una diversidad de signos y síntomas clínicos que varían desde fatiga acentuada. somnolencia. anorexia, náuseas, congestión nasal y cefalea frontal, hasta un síndrome clínico más definido que comprende la aparición brusca de escalofríos, a las cuatro u ocho horas de finalizar la inyección intravenosa, a los que siguen temperatura elevada, dolor de espalda. calambres, vómitos y síntomas urinarios, como micción frecuente y urgente. Los síntomas desaparecen en doce horas; los análisis de orina revelan pequeñas alteraciones y la leucopenia se normaliza en pocos días. Los factores que deben considerarse en la etiología de esta reacción son: la eliminación de uno o más de los oligoelementos del organismo y el efecto tóxico de un quelato metálico específico formado en el propio organismo. La primera parece la explicación más acertada y se correlaciona con las sugerencias hechas por los autores sobre la posible etiología del trastorno renal inducido en ratas por los agentes quelantes.

Soy consciente de que las cadenas que me aprisionan son las que menos me pesan, pero con vosotros, benévolos oyentes, no estáis en mi caso, dejo ya este mi dilecto tema.

Osa agradezco sinceramente la atención que me habéis dispensado y deseo que, como decía al principio de mi disertación, haya habido vida en ella. He procurado no ser excesivamente prolijo en la exposición discursiva, acordándome de aquellas convincentes palabras de nuestro Séneca: *No nos debe importar vivir mucho, sino vivir lo bastante.*

He dicho.

## NOTA ONOMASTICA BIBLIOGRAFICA

ABESHOUSE y EWINGBERG: *Journ. Urol.*, 65, 316, 1951.—ALBAREDA HERRERA: *Los oligoelementos en Geología y Biología*. Madrid, 1952.—ALBERT y sus colaboradores: *Brit. J. Exper. Path.*, 26, 160, 1945; 28, 69, 1947; 34, 119, 1953, y 35, 75, 1954; y *Biochem. J.*, 41, 534, 1947.—ALONSO y SANTOS RUIZ: *El Monitor de la Farmacia*, 54, 205, 1948.—ALTMANN y CROOK: *Nature*, 171, 76, 1953.

BACQ y HERVE: *Arch. Internat. de Physiol.*, 61, 433, 1953.—BAIR y HUNGATE: *Science*, 127, 813, 1958.—BEATTIE: *Proc. Ohio State Hort. Soc.*, 175, 1954.—BECKETT, VAHOTA y ROBINSON: Comunicación a la British Pharmaceutical Conference, 1958 (*Pharm. J.*, 181, 295, 1958).—BELCHER: *Chemist. Analyst.*, 46, 86, 1957.—BERG: *Die spurenelement in unserer Nahrung und in unserem Körper*. Leipzig, 1940.—BERGEL: *Semana Méd.*, 100, 807, 1952.—BERMEJO: *Química e Industria*, 3, 13, 1956.—BERTRAND: *Ergebnisse. Vitamin und Hormonforschung*, 2, 191, 1938.—BODINE y FRITZGERALD: *J. Cell. Comp. Physiol.*, 33, 215, 1949.—BROWN y ADAMS: *Science*, 120, 723, 1954.

CARDA: *Metabolismo mineral*. Madrid, 1949.—CAVIER y SAVEL: *Prod. Pharm.*, 13, 41, 1958.—CHAPMAN: *Nature*, 887, 1954.—CHENG, YODER, STORY y BURROUGHS: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 61, 652, 1955.—CHENOWETH: *Pharmacological Reviews*, marzo, 57, 1956.—CLANCY, FELDMAN, ALDRICH y CANDON: *Antibiotic. Med. Clin. Therap.*, 5, 167, 1958.—CLARK: *The Analyst*, 82, 177, 182 y 760, 1957.—CLARK y GEISSMAN: *J. Pharmakol. Exper. Therap.*, 95, 363, 1949.—COTTER: *J. Am. Med. Assoc.*, 166, 735, 1958.—CRAMPTON: *Symposium on Mineral Nutrition*, Lakeland, Fla., abril 1957.—CRESCITELLI: *Am. J. Physiol.*, 163, 197, 1950.—CURRAN: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 88, 101, 1955.—CSAPO y ANDRASSY: *Wiener Klin. Woch.*, 70, 788, 1958.

DANIEL: *Mineral needs of man trace elements*. U. S. Dept. Agr. Year book, 1939.—DANTÍN GALLEGU: *Rev. Iby*s, 16, 175, 1958.—DATTA, LEVERMAN y RABIN: *Biochem. J.*, 68, 22 p. 1958.—DAUBENMERKL: *Act. pharmacol. toxicol.*, 9, 1, 1953.—70, 788, 1958.

DANIEL: *Mineral needs of man trace elements*. U. S. Dept. Agr. Year book, 1939.—DANTÍN GALLEGU: *Rev. Iby*s, 16, 175, 1958.—DATTA, LEVERMAN y RABIN: *Biochem. J.*, 68, 22 p. 1958.—DAUBENMERKL: *Act. pharmacol. toxicol.*, 9, 1, 1953.—DAVIS: *Symposium on Mineral Nutrition*, Lakeland Fla. Abril 1957.—DAVIS y METZLER: 134 Meeting Am. Chem. Soc. 37 C. Chicago. Septiembre 1958.—DEÁN GUELLENZU: *Anal. R. Acad. Farm.*, núm. 1, 57, 1953, y *Los oligoelementos* (en prensa). Madrid.—DEÁN GUELLENZU, LÓPEZ AZCONA y SANTOS RUIZ: *Rev. Esp. Fisiol.*, 7, 63, 1951; 8, 117 1952; *Anal. Fis. Quim.*, 42, 508, 1946, y *Anal. Inst. Esp. Edaf. Ecol. y Fisiol. Veg.*, 3, 1, 1944.—DEÁN GUELLENZU y SANTOS RUIZ: Ponencia presentada al XXIII Congreso Internacional de Química Industrial. Milán, septiembre 1950, y *Chim. Ind.*, núm. 2 bis, 186, 1952.—DEÁN GUELLENZU, SANTOS RUIZ, LÓPEZ AZCONA, COMENGE GERPE y SAMPEDRO PIÑEIRO: Comunicación presentada al II Congreso Internacional de Bioquímica. París, julio 1952.—DIEHL: *Chem. Rev.*, 21, 39, 1937.—DUDLEY: *Jour. Lab. Clin. Med.*, 45, 792, 1955.

EAGLE, MAGNESON y FLEISCHMAN: *J. Chem. Assoc.*, 25, 451, 467, 474, 480, 497, 528, 541, 549 y 557, 1946.—EGGLESTON: *Biochem. J.*, 68, 557, 1958.—ENSMINGER: *Symposium on Mineral Nutrition*. Abril 1957. Lakeland, Fla., y *Agric. Food. Chem.* número 5, 324, 1957.

FARR: *Chem. Ing. News.*, 9 de julio de 1944, 1956 y V Simposio Nacional de Medicina. East Lansing. Michigan. — FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, LÓPEZ AZCONA y SANTOS RUIZ: *Rev. Esp. Fisiol.*, 14, 1, 1958.—FLASCHHENTRÄGER: *Schweiz Med. Wschr.*, 949, 1951.—FOREMAN: *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 42, 629, 1953.—FOYE y DUVAL: *J. Am. Pharm. Assoc.*, 47, 282 y 285, 1958.—FOYE y JEFFREY: *J. Am. Pharm. Assoc.*, 44, 267, 1955.—FRANKLIN, ROHSE, HUERGA y KOMP: *J. Am. Med. Assoc.*, 166, 1,585, 1958.

GILBERT: *Universal nutrition of plants and animals*. Londres, 1950.—GLATZEL: *Handbuch inhere Medizin*, VI/2, 532, 4.ª edición. Berlín-Gotinga-Heidelberg, 1954, y *Med. Klin.*, 50, 1,659, 1955.—GREEN, MACCARTHY y KING: *J. Biol. Chem.*, 128, 447, 1939.—GUIRAD y SNELL: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 648, 1958.



Viena, septiembre 1958.—SANTOS RUIZ, LÓPEZ AZCONA y SAMPEDRO PIÑEIRO: *Rev. Esp. Fisiol.*, 4, 163, 237, 1948, y 4, 237, 1949.—SANTOS RUIZ y PORTÚS SERRANO: *Rev. R. Acad. Ciencias*, 41, 1945.—SANTOS RUIZ y SANTOS MERINO: *Anal. Fis. Quím.*, 42, 1.147, 1946.—SANTOS RUIZ y SANZ MUÑOZ: *Anal. Fis. Quím.*, 43, 426, 1947.—SANTOS RUIZ, VILLAR PALASÍ, PORTÚS SERRANO y SANZ MUÑOZ: *Rev. Esp. Fisiol.*, 5, 213, 1949.—SCHARRER: *Biochemie der Spurenelemente*, 2.<sup>a</sup> edición. Berlín, 1956.—SCHRODER, PERRY, MENHARDT y DENNIS: *J. Lab. Clin. Med.*, 46, 416, 1955.—SCHUBERT: *Chimia*, 11, 113, 1957.—SCHUTZ y colaboradores: *Stomatología*, 14, 35, 1957.—SCHWARZ: *Aerzt. Wschr.*, 743, 1957.—SCHWARZENBACH: *Anal. Chim. Acta*, 7, 141, 1952.—SCHWARZENBACH y colaboradores: *Helv. Chim. Acta*, 28, 828, 1945; 30, 1.798, 1949; 31, 331, 459, 678 y 1.029, 1948, y 32, 1.175, 1.682, 1949.—SEKLES: *Algunos problemas de bioquímica veterinaria*. Madrid, 1950 y Conferencia en el III Cong. Int. de Bioquímica. Bruselas, agosto 1955.—SEVEN: *Antibiotic Med. Clin. Therap.*, 5, 251, 1958.—SHAPIRO: *Science*, 127, 702, 1958.—Simposio Council on Foods and Nutrition. American Medical Association. Chicago. Illinois, 1955.—SINGHER y LOWEY: *U. S. Pat.*, 2, 705, 815 (*Chem. Abs.*, 52, 667 b, 1958.—SPENCER, SAMACHSON y LAZLO: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 97, 565, 1958.—STILES: *Trace elements in plants and animals*. Nueva York, 1946.—STEWART y LONARD: *Fruit Nutrition*.—SOMERVILLE, N. J.: *Science*, 116, 564, 1954. La utilización de la energía atómica con fines pacíficos, XII, 180, Naciones Unidas. Ginebra, 1956.—STOUT: *Agric. Food. Chem.*, diciembre, 1.000, 1956.—SUBY, ALDRIGHT, WAYNE y DEMPSEY: *Jour. Urol.*, 66, 527, 1951.—SZENT-GYÖRGY: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 61, 732, 1955.

TORRES: *Anal. R. Acad. Farm.*, 23, 37, 1957.—TRUFFERT: Abstracts of Papers 3rd. International Cong. of Nutrition: Amsterdam 54, 1954.

VARELA, SANZ y CASTELLÓ: *An. Fac. Vet. Univ. Madrid*, 4, 203, 1952.

WALLACE: The Diagnosis of mineral deficiencies in plant. Londres, 1943.—WALLACE y NORTH: *California Agricult.*, 7, 10, 1956.—WARING y WERKMAN: *Arch. Biochem.*, 303, 1942.—WEINBERG: *Bact. rev. por J. Pharm. Belg.*, 465, 1957.—WELCHER: *The Analytical Uses of Ethylenediaminetetraacetic acid*. D. Van Nostrand Co. Inc., Princeton, Nueva York, Toronto y Londres, 1958.—WENDT: *Archiv Pharm.*, 28, 33, 1958.—WERNER: *Neue Anschauungen auf dem Gebiet der anorganischen Chemie*. F. Wieweg e. hijo. 4.<sup>a</sup> edición. Brusoswick, 1920.—WESTGATE: *WELCHER: The Analytical Uses of Ethylenediaminetetraacetic acid*. D. Van Nostrand Co. Inc., Princeton, Nueva York, Toronto y Londres, 1958.—WENDT: *Archiv Pharm.*, 28, 33, 1958.—WERNER: *Neue Anschauungen auf dem Gebiet der anorganischen Chemie*. F. Wieweg e. hijo. 4.<sup>a</sup> edición. Brusoswick, 1920.—WESTGATE: *Proc. Florida State Hort. Soc.*, 65, 143, 1956.—WILBRANDT: *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 16, 31, 1958.—WILL y VILTER: *J. Lab. Clin. Med.*, 44, 499, 1954.—WILLS: *Bibliography of references to the literature in the minor elements and their relation to the Science of plant nutrition*. Chilean nitrate. Educ. Bar. Nueva York, 1939 (y suplementos).—WIRSHAFTER: *Mineral in nutrition*. Nueva York, 1942.—WOLF, MASKE, STAPFEL y BAUMGARTEN: *Arch. exper. Path. Pharmacol.*, 216, 442, 1952.

YUSTA y SANTOS RUIZ: *Anal. Fis. Quím.*, 50, 95, 1954.

ZENTMEYER: *Phytopathology*, 33, 1.121, 1943, y *Science*, 100, 294, 1944.



HAERTI y MARTELL: *Agr. Food. Chem.*, enero 26, 1956.—HARDY, ELKINS, RUOTOLO, QUIMBY y BAKER: *J. Am. Med. Assoc.*, 154, 1.171, 1954.—HART y LAZZLO: *Science*, 118, 24, 1953.—HERRIDGE: *Brit. Med. J.*, núm. 5.089, 140, 1958.

IRVING y WILLIAMS: *J. Chem. Soc.*, 1.192, 1953, 1956.—IWAMOTO y ADAMS: *Feder. Proc.*, 13, 370, 1954.

JACOBSON: *Plant. Physiology*, 26, 411, 1951.—J. M. R.: *Chem. Products.*, 21, 371, 1958.—JOHNSTON: *J. of Scien. Technol.*, 37, 522, 1956.

KADOTA y ABE: *J. Lab. Clin. Med.*, 43, 375, 1954.—KAUFMAN y ADAMS: *Science*, 120, 723, 1954.—KELLER: *Z. Vitamin. Hormon und Fermentforschung*, 9, 297, 1957-58.—KOJAHL y LUCAS: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 3.931, 1954.—KROL y colaboradores: *Am. Chem. Soc.*, 131 Meeting, 4 A, 1957.

LA: *Med. Hyg.*, núm. 384, 16, 1958, y *Sem. Hop. Paris*, 8, 308, 1958.—LAMB, BENTLEY y BEATTIE: *Trace elements*. Academic Press. Inc. Publ. Nueva York, 1958. LANG: *Deutsch. med. Rundschau*, 877, 1949.—LANGERON, PAGET, CROCCEL y ROUTIER: *Press. Med.*, 66, 1.248, 1958.—LEINGRÜBER: *Med. Hyg.*, núm. 387, 80, 1958.—LEITCH y HALEY: *Arch. Int. Pharm.*, 95, 234, 1953.—LEONARD y STEWART: *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 66, 49, 1954.—LIEBERMANN: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 31, 1.225, 1949, y *Nature*, 164, 162, 1949.—LONGCOPE y LEUTSCHER: *J. Clin. Inv.*, 25, 577, 1946.—LONGENECKER y SNELL: *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 142, 1957.—LÓPEZ AZCONA, DEÁN GUEL BENZU y SANTOS RUIZ: *Rev. Inst. Geol. y Min.*, 43, 7, 1945.—LÓPEZ AZCONA, SANTOS RUIZ y DEÁN GUEL BENZU: *Anal. Fis. Quím.*, 41, 1.358, 1945; 42, 825 y 833, 1946, y *Rev. Esp. Fisiol.*, 8, 13 y 149, 1952.—LÓPEZ AZCONA, SANTOS RUIZ y SAMPEDRO PIÑEIRO: *Rev. Esp. Fisiol.*, 4, 229, 1949.

MAC CANCE y WIDDOWSON: *Nature*, 157, 837, 1946.—MAC DONALD: *Nature*, 157, 837, 1946.—MALCOLM: *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 66, 180, 1953.—MARTELL: *J. Chem. Education*, 29, 270, 1952.—MARTELL y CALVIN: *Chemistry of the metal chelate compounds*. Prentice Hall. Inc. Nueva York. 2.ª edición, 1953, y traducción alemana Verlag Chemie. G. M. B. H. Weinheim. Bergstr., 1958.—MAYNARD y FINK: *J. Clin. Invest.*, agosto, 301, 1956.—MAYOR: *Rev. Méd. Est. Gen. Navarra*, 2, 49, 1958.—MELLOR y MALLEY: *Nature*, 159, 370, 1947, y 161, 436, 1958.—MELTZER: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 405, 1957.—MELTZER y colaboradores: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 648, 1954.—METOLER, IKAWA y SNELL: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 648, 1954.—FINK: *J. Clin. Invest.*, agosto, 301, 1956.—MAYOR y *Tech. Commun. An. Navarra*, 2, 49, 1958.—MELLOR y MALLEY: *Nature*, 159, 370, 1947, y 161, 436, 1958.—MELTZER: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 405, 1957.—MELTZER y colaboradores: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 648, 1954.—METOLER, IKAWA y SNELL: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 648, 1954.—MITCHELL: *Aberdeen Analyst.*, 71, 361, 1946, y *Tech. Commun.*, 44, 1948.—MOEWUS: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 61, 660, 1955.—MORGAN y DREW: *J. Chem. Soc.*, 117, 1.456, 1920.—MÖRNER-WILLIAMS: *Trace elements in Food*. Nueva York, 1950.

NIKIJORUK y SREBNY: *Jour. Dent. Research*, 32, 859, 1953.—NUSBAUM: *Am. Chem. Soc.* 131 Meeting 8A, 1957.

PALO: *Minerv. Gynec.*, 6, 811, 1954.—PAULET: *Presse. Med.*, 66, 1.435, 1958.—PERKINS: 373 Meeting de la Biochemical Society. Edimburgo, 17 de mayo de 1958. PERRANET y CLAVEL: *Gaz. Med. de France*, 64, 1.999, 1957.—PETERS, STOCHER y THOMPSON: *Nature*, 15, 676, 1945.—PIBRIL: *The Analyst.*, 83, 188, 1958.—PIPER: *J. Agr. Sci.*, 32, 143, 1942.—POPOVICI, GESCHICKTER, REINOVSKY y RUBIN: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 74, 415, 1950.—PROESCHER: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 76, 619, 1951.—PUIGDOLLERS: *Proc. Therap. Clin.*, 11, 535, 1958.

RAHEEM y AMIN: *Z. für Analyt. Chem.*, 163, 340, 1958.—REITH: *Voeding.*, 3, 4, 1941.—REX COMAN: *Cancer Research*, 24, 519, 1954.—ROOT y CHEM: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 104, 404, 1952.—ROUHER: *Press. Med.*, 66, 946, 1958.—RUBIN: Comunicación del Chemo Medical Research Institute. Georgetown University. Washington, 1955.

SAMPEDRO, LÓPEZ AZCONA y SANTOS RUIZ: *Rev. Esp. Fisiol.*, 4, 233, 1949.—SANTOS RUIZ: *Bioquímica de los elementos*. Madrid, 1945, y Pontificia Academia Scientiarum. *Scripta. Varia*, 14, 389, 1956.—SANTOS RUIZ, COMENGE GERPE y LÓPEZ AZCONA: *Anal. R. Acad. Farm.*, 1, 89, 1944.—SANTOS RUIZ, DEÁN GUEL BENZU y LÓPEZ AZCONA: *Anal. Fis. Quím.*, 42, 657, 1946; *Anal. R. Ac. Farm.*, 13, 269, 1947; *Rev. Esp. Fisiol.*, 8, 49, y 207, 1952.—SANTOS RUIZ, FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, DEÁN y LÓPEZ AZCONA: Comunicación al IV Congreso Internacional de Bioquímica